



SYLVAIN GUTJAHR

ANALYSE DES CARACTÈRES D'INTÉRÊT MORPHOGÉNÉTIQUES ET BIOCHIMIQUES POUR LE DÉVELOPPEMENT DE SORGHOS SUCRÉS À DOUBLE USAGE « GRAIN-BIOALCOOL »

Thèse présentée
à l'École Doctorale SIBAGHE
dans le cadre du programme de doctorat en Biologie Intégrative des Plantes (BIP)
pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université Montpellier II



Sous la supervision de :

Michaël Dingkuhn (Directeur de thèse)
Delphine Luquet
Anne Clément-Vidal
Michel Vaksman

Soutenue publiquement le 05 juillet 2012 devant le jury composé de :

M. Stefano AMADUCCI, *Professeur, Università Cattolica del Sacre Cuore, Italie*
M. Gilles BELANGER, *Professeur associé, Agriculture et Agroalimentaire Canada*
M. Yves GIBON, *Chercheur, INRA de Bordeaux*
M. Christophe SALON, *Professeur, INRA de Dijon*
Mme Dominique THIS, *Maître de conférence, Montpellier SupAgro*
M. Michaël DINGKUHN, *Chercheur, Cirad/IRRI*

Examineur
Examineur
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Directeur de thèse



Vendredi 10 juillet 2009. Lendemain de la journée de semis à la station agronomique de l'Institut d'Économie Rurale (IER) à Cinzana, Mali.

Résumé

Dans l'optique de produire des agro-carburants, le sorgho sucré est aujourd'hui proposé comme une alternative à d'autres espèces cultivées à grande échelle comme la canne à sucre et le maïs car il présente plusieurs avantages : le sorgho est résistant à la sécheresse et à la chaleur, il nécessite peu d'intrants, a en moyenne un cycle de culture relativement court (3-4 mois) comparé à la canne à sucre. Il offre une grande diversité génétique à explorer et exploiter, tout en étant génétiquement moins complexe que la canne à sucre. Finalement, il peut être cultivé pour un double usage, le grain pouvant être utilisé comme source d'alimentation pour l'homme ou le bétail (à partir du grain) et le jus sucré contenu par les tiges comme source pour la production d'agrocarburants. Cette polyvalence en fait une culture idéale pour lutter contre la compétition entre cultures énergétiques et cultures vivrières et assurer des rendements dans des environnements de culture sujets au stress hydrique et thermique comme c'est le cas en Afrique de l'Ouest. Cependant, le caractère sucré du sorgho est complexe, car sous l'influence d'interactions Génotype X Environnement (G x E). Aussi, les mécanismes métaboliques, morphologiques ou phénologiques constituant la cinétique d'accumulation des glucides dans la tige et son éventuelle compétition avec le remplissage des grains restent mal connus ou très controversés dans la littérature. La présente thèse, réalisée dans le cadre du projet européen *Sweetfuel*, vise à comprendre ces mécanismes, afin de contribuer à la définition d'idéotypes de sorgho double usage, pour les environnements soudano-sahéliens.

Sur la base d'études expérimentales au champ au Mali et en serre en France, il a pu être démontré que les glucides sont accumulés dans les entrenœuds des tiges par un jeu d'activités enzymatiques (favorisant l'accumulation d'hexoses puis de saccharose) dès le début de leur élongation, donc potentiellement avant la floraison. Au Mali, l'étude au champ de 14 génotypes adaptés aux conditions locales, plus ou moins sensibles à la photopériode et semés à trois dates différentes, a démontré le bénéfice d'un rallongement de la phase végétative sur la quantité de sucre accumulée dans les tiges de la plante à floraison, du fait d'un plus grand nombre d'entrenœuds allongés et du temps à leur disposition pour accumuler des glucides avant ce stade. Ce bénéfice était cependant plus lié à la plus grande quantité de biomasse accumulée (taille des tiges) qu'à la concentration en sucre dans les entrenœuds (plutôt stable entre dates de semis).

Ainsi, la durée de la phase végétative et la sensibilité à la photopériode sont proposées être des paramètres clés favorisant la quantité de glucides accumulée dans les tiges de la plante à floraison. D'autre part, il a été montré que la quantité de glucides présente à maturité dans les tiges des mêmes génotypes ne différait pas ou peu de celle à floraison, une éventuelle réduction pour quelques génotypes n'étant généralement pas significative et évitable par l'allongement du cycle. De plus, cette quantité de glucides dans les tiges à maturité n'a tiré aucun bénéfice de l'ablation de la panicule à floraison chez les mêmes génotypes. Ces résultats suggèrent que la compétition entre le remplissage du grain et la production de sucre est faible chez le sorgho, d'autant plus faible que la plante présente de grandes tiges et donc un grand compartiment de stockage des glucides, tamponnant cette éventuelle compétition. D'ailleurs, à une échelle plus fine, aucune différence n'a pu être mise en évidence en termes d'activité des principales enzymes du métabolisme carboné dans la tige d'un génotype dans sa version stérile (pas de remplissage du grain) et fertile.

Ce travail a démontré le potentiel du sorgho pour une double utilisation dans un contexte soudano-sahélien et la pertinence d'exploiter la diversité génétique de cette espèce pour cette objectif de sélection. Les résultats obtenus offrent aujourd'hui une meilleure vision des approches de phénotypage à adopter vers l'étude génétique des caractères favorisant le développement de sorgho double usage plus performants. Les connaissances acquises sont actuellement utilisées pour améliorer la modélisation des interactions G x E sous-jacentes à la production de sucre et de grains chez le sorgho, qui pourra alors contribuer à l'exploration d'idéotypes face à des environnements cibles.

**Analyse des caractères d'intérêt morphogénétiques
et biochimiques pour le développement de sorgho
sucrés à double usage « grain-bioalcool »**

**Analysis of useful morphogenetic and biochemical
traits for the development of dual-purpose “grain-
bioethanol” sweet sorghums**

Abstract

Sweet sorghum offers many advantages as an alternative to widely cultivated crops such as corn and sugarcane to produce biofuels: it is resistant to water stress, it requires few inputs; it has a shorter growth cycle compared to sugarcane in particular. Sorghum also exhibits a great genetic diversity and is genetically less complex than sugarcane. Finally, sorghum can be cultivated for dual-purpose uses, using grains for food or feed and sweet juice for biofuel production. Hence, sorghum is a promising option to reduce the competition for land and (water) resource use between food and fuel, in particular in cropping environments with high drought and heat stress frequency, as in West Africa. However, stem sweetness is a complex trait prone to genotype x environment interactions (G x E). The metabolic, morphological and phenological mechanisms involved in the kinetic of stem sugar accumulation and their possible competition with grain filling are largely unknown or controversial in the literature. The present work is part of the European project *Sweetfuel* and aims at better understanding these mechanisms and contributing to define dual-purpose sorghum ideotypes for soudano-sahelian conditions.

Based on field and greenhouse experiments respectively in Mali and France, it was found that sugars start accumulating in stem internodes at the onset of their elongation, i.e. potentially soon before the plant flowers. The successive accumulation of hexose and then sucrose in internodes could be dynamically explained by changes in the activity of key enzymes related to sucrose metabolism. In Mali, a field experiment performed on 14 genotypes, contrasted for photoperiod sensitivity and sown at three planting dates highlighted the interest of increasing vegetative phase duration to increase sugar yield. This was explained first of all by the higher number of internodes that could expand during a longer vegetative phase, and thus, by the higher production of stem biomass, and, to a minor extent, by the longer time for internodes to mature and accumulate sugar (sugar concentration in the stem was however fairly stable across sowing dates). Also, vegetative phase duration and photoperiod sensitivity can be considered as two key parameters promoting stem sugar content before grain filling. In the same time, it was shown that stem sugar content kept remarkably constant between anthesis and maturity in most of studied genotypes and that the reduction observed for some genotypes was overcome with an early sowing. Moreover, sugar accumulation in the stem between flowering and maturity did not

benefit from panicle pruning. These results together suggest that the competition for carbohydrates between stem sugar reserves and grain filling is weak; it is even weaker for big/large stem genotypes with huge sugar reserves in the stem that would buffer a post-flowering allocation of sugar from the stem to the grains if required. This low competition was confirmed at a finer scale, as no differences were observed in the activity of key enzymes of sucrose metabolism between the sterile and the fertile line of a same genotype.

This work demonstrates the potential of sorghum for dual-purpose in particular for soudano-sahelian cropping conditions and the interest of using its genetic diversity for this breeding purpose. It provides further knowledge for revisiting the phenotyping strategies to be adopted to investigate the genetic basis of sugar and grain production and their combination. The results are also currently used to improve the way the source-sink relationships underlying this dual production are formalized in crop and plant models at CIRAD. Such models will be then useful to assist sorghum ideotype exploration for dual purpose.

Remerciements

Je remercie Michaël Dingkuhn, mon directeur de thèse, et Delphine Luquet, mon encadrante principale, de m'avoir donné l'opportunité de poursuivre mon chemin dans ces longues études et de m'avoir fait découvrir le Mali, un pays très attachant, et le sorgho, que je commence à planter partout où je passe. Je les remercie également pour les derniers jours intenses passés à corriger ce mémoire à distance, entre la métropole, la Réunion et les Philippines.

Je tiens à remercier grandement toutes les personnes qui ont permis à ce projet de voir le jour, qu'elles soient du Cirad ou d'une autre structure. J'aimerais témoigner ma reconnaissance à toutes les personnes qui m'ont supporté pendant ces trois dernières années et tant appris dans leurs spécialités : Anne Clément-Vidal, pour ta patience et tes conseils en biochimie ; Gilles Trouche, pour les milliards de réponses à mes questions ; Michel Vaksman, pour ton accueil et ton soutien sur le terrain et tes conseils de « survie » ; Serge Braconnier ; Nicole Sonderegger, pour nos discussions au laboratoire ; Jacques Chantereau et David Pot pour votre aide sur le terrain ; Denis Fabre, Sylvie Jaffuel, Daniel Clavel, Sylvie Lewicki-Dhainaut, Tanguy Lafarge, Philippe Oriol ; Alain Vidal, Jean-Charles Evrard et Joseph M'Balla, mes fournisseurs de graines ; Kirsten vom Brocke, et tous les collègues d'AIVA puis PAM et GIV ; Cécile et Camilla, mes coloc' de bureau ; Grégory, Lauriane, Jean-Christophe, Alain A., Audrey, Sandrine, Julien, sans oublier Denise et Rolande ; Nathalie, merci de toujours avoir été là pour nous sortir des galères. Je remercie également toutes les personnes des autres équipes de recherche, et particulièrement l'équipe sorgho du Cirad pour leur disponibilité.

Et puis, ... un énorme merci à toutes les personnes qui étaient avec moi sur le terrain au Mali, à Cinzana en 2009 et 2010 et à Sotuba en 2010 : Mamoutou Kouressy, Lassenou Koita, Mahamady Kané, Korothimi Thera qui a travaillé avec moi durant ces trois dernières années, Amadou Nèkèba Diarra, notre chauffeur, guide et soutien logistique, et toutes les personnes qui ont géré mes essais quand j'étais en métropole. Merci à Armelle Soutiras, pour les analyses et sa compagnie, Julie Klein et à toute l'équipe de serristes du Cirad qui était toujours là quand j'avais besoin d'aide, même le week-end et jours fériés.

Enfin, je remercie énormément mon jury, Mme Dominique This et MM. Stefano Amaducci, Gilles Bélanger, Yves Gibon, Christophe Salon, d'avoir accepté de juger ce travail.

En espérant n'avoir oublié personne, mais cela sera certainement le cas bonne lecture.

Avant-Propos

Cette thèse est présentée sous la forme d'une compilation de 6 chapitres. Elle comprend une introduction générale (chapitre 1), une revue de littérature (chapitre 2) et une conclusion générale (chapitre 6) qui sont écrites en français. Le travail de recherche à proprement parlé est décrit dans les chapitres 3, 4 et 5. Ces chapitres ont été rédigés en anglais selon le format approprié à des fins de publication dans des revues scientifiques à comité de lecture.

Les trois chapitres ont été soumis à la revue *Functional Plant Biology*. Suite aux commentaires des relecteurs et de l'éditeur, les chapitres 3 et 4 ont été fusionnés et synthétisés en un seul et même article, qui sera accepté après révisions. Il sera intitulé « Grain, sugar and biomass accumulation in tropical sorghums. I. Trade-offs and effects of phenological plasticity ». Le chapitre 5 a été accepté par cette revue et s'intitulera : « Grain, sugar and biomass accumulation in tropical sorghums. II. Biochemical processes at internode level and interaction with phenology ».

Mots clés : sorgho sucré, photopériodisme, métabolisme du carbone, saccharose, enzymes, relations source-puits

Keywords: sweet sorghum, photoperiod-sensitivity, carbon metabolism, sucrose, enzymes, source-sink relationships

Cette thèse a été réalisée à Montpellier au sein de l'équipe Plasticité phénotypique et Adaptation des Monocotylédones (PAM) de l'UMR AGAP « Amélioration Génétique et Adaptation des Plantes méditerranéennes et tropicales ».

Les travaux présentés ont pu être réalisés grâce aux financements du 7^{ème} Programme-Cadre de Recherche et Développement de l'Union européenne (FP7) alloués au projet *Sweetfuel*.

A ma famille, Julie, M-Z.

Table des matières

Chapitre 1.....	1
1.1. Le besoin de produire des agrocarburants	2
1.2. Les cultures multi-usages	3
1.3. Le projet européen <i>Sweetfuel</i>	4
1.4. Problématique de la thèse	6
1.5. Objectifs, approches et plan de la thèse	7
1.5.1. Objectifs de la thèse	7
1.5.2. Expérimentations et choix des variétés	7
1.5.3. Plan de la thèse	10
Chapitre 2.....	11
2.1. Le sorgho	12
2.1.1. Le genre <i>Sorghum</i>	12
2.1.2. Biologie du sorgho	12
2.1.3. La culture du sorgho en Afrique de l'Ouest.....	13
2.1.4. Le rôle du photopériodisme dans la culture du sorgho	14
2.1.5. Les sorghos sucrés	16
2.1.6. Le sorgho, une culture multi-usage.....	18
2.2. Métabolisme des glucides et relations sources-puits de carbone chez les plantes supérieures	19
2.2.1. La fixation du carbone dans les feuilles.....	19
2.2.2. Sources et puits de C chez les plantes supérieures.....	20
2.2.3. Synthèse et exportation du saccharose	21
2.3. Le métabolisme des glucides chez le sorgho.....	22
2.3.1. Mise en place des réserves C chez le sorgho	22
2.3.2. Remobilisation des réserves C chez le sorgho.....	23
2.3.3. Le métabolisme du saccharose dans la tige	24
Chapitre 3.....	26
3.1. Abstract	27
3.2. Introduction.....	27
3.3. Materials and methods	29
3.3.1. Plant material	29
3.3.2. Study site and experimental design	29
3.3.3. Plant growth measurements	30
3.3.4. Phyllochron and thermal time (TT) calculation	30
3.3.5. Sugar quantification	31
3.3.6. Data analysis.....	31
3.4. Results	32
3.4.1. Effect of sowing date on plant growth and phenology	32
3.4.2. Relationship of growth duration and phyllochron with day length	33
3.4.3. Sugar storage in internodes at anthesis	33
3.4.4. Relationships among variables observed at anthesis	34
3.5. Discussion	34
3.5.1. Phenology is a driver of dry matter and sugar accumulation in sweet sorghum.....	34
3.5.2. Trade-offs between structural vs. non-structural biomass and stem moisture content	35

3.5.3.	Traits contributing to high dry matter and sugar accumulation at anthesis.....	36
Chapitre 4.....		45
4.1.	Abstract	46
4.2.	Introduction.....	46
4.3.	Materials and methods	48
4.3.1.	Plant material, study site and experimental design.....	48
4.3.2.	Sampling and plant growth measurement.....	48
4.3.3.	Sugar quantification	48
4.3.4.	Data analysis.....	49
4.4.	Results	49
4.4.1.	Grain yield and stem structural dry weight.....	49
4.4.2.	Stem sugars at grain maturity	49
4.4.3.	Change in stem sugar concentration between anthesis and grain maturity	50
4.4.4.	Correlations among observed variables.....	51
4.4.5.	Effect of panicle pruning on stem sugar at maturity.....	52
4.5.	Discussion	52
4.5.1.	Brix is a poor indicator of stem sugar accumulation	52
4.5.2.	Grain yield and the role of the panicle sink in stem sugar dynamics.....	53
4.5.3.	Genotype and environment effects on stem sugar accumulation.....	54
4.5.4.	Contradicting reports on sweet sorghum are related to type of germplasm	56
4.5.5.	New questions and hypotheses	56
Chapitre 5.....		66
5.1.	Abstract	67
5.2.	Introduction.....	67
5.3.	Materials and methods	69
5.3.1.	Plant material and growing conditions	69
5.3.2.	Plant monitoring and harvest under 13h-PP.....	70
5.3.3.	Plant monitoring and harvest under 12h-PP.....	70
5.3.4.	Plant growth measurements	71
5.3.5.	Harvest procedure for biochemical analysis	71
5.3.6.	Carbohydrate quantification	71
5.3.7.	Enzyme extraction and assays.....	72
5.3.8.	Gas exchange measurements.....	73
5.3.9.	Statistical analysis.....	73
5.4.	Results	73
5.4.1.	Effect of panicle sterility on plant phenology and phenotype	73
5.4.2.	Effect of photoperiod on plant phenology.....	74
5.4.3.	Effect of photoperiod on leaf production and senescence	74
5.4.4.	Effect of photoperiod on stem growth.....	74
5.4.5.	Sugar storage in stems	75
5.4.6.	Sugar storage at the individual internode level	75
5.4.7.	Sugar and dry weight yields at whole-plant scale	76
5.4.8.	Gas exchange measurements.....	76
5.4.9.	Activity of enzymes of sugar metabolism in internode tissue	77
5.5.	Discussion	77
5.5.1.	Photoperiod affected plant morphogenesis, architecture and phenology.....	78
5.5.2.	The onset of sucrose accumulation is driven by age of internodes and not directly by plant phenology.....	78
5.5.3.	However sugar accumulation in plant stem was sensitive to plant phenology	79

5.5.4.	No grain does not necessarily mean more sugars	79
5.5.5.	Role of different sugars and of sucrose-metabolism related enzymes.....	81
5.5.6.	Comparison of sucrose accumulation in sweet sorghum and sugarcane	82
Chapitre 6.....		93
6.1.	Discrimination des plantes pour les caractères sucré et juteux de la tige	94
6.1.1.	Limite du brix pour le phénotypage du caractère sucré des plantes	94
6.1.2.	Jutosité, couleur de la nervure et rendements en sucres	96
6.2.	L'accumulation de saccharose se produit avant floraison chez les variétés sucrées de sorgho cultivées en conditions optimales.....	97
6.3.	La concentration en glucides dans l'entrenœud dépend de son âge	98
6.4.	Rendements élevés en grains et accumulation de glucides ne sont pas incompatibles..	99
6.5.	La biomasse de tige et la durée du cycle sont deux critères clés d'une production élevée de glucides	99
6.6.	Accumulation de glucides : importance d'adresser les activités enzymatiques en fonction du stade de croissance et de développement de la plante et des entrenœuds.....	100
6.7.	Supprimer la panicule ne permet pas d'augmenter significativement la production de glucides	101
6.8.	Conclusion et perspectives.....	103
6.8.1.	Potentiel des variétés étudiées pour un double usage dans les conditions d'études : vers la définition d'un idéotype.....	103
6.8.2.	Etudes à mener pour le futur vers des idéotypes de sorgho double usage.....	104
6.8.3.	Perspectives vers d'autres projets	106
	References	107

Liste des tableaux

Table 3-1. Geographical origin, racial classification, plant height, photoperiod (PP) sensitivity and duration of the complete growth cycle of the 14 accessions of the CIRAD sorghum core collection (Montpellier) evaluated in Bamako, Mali in 2010. CAF, Central African Republic; CMR, Cameroon; ETH, Ethiopia; IND, India; NER, Niger; SDN, Sudan; TZA, Tanzania; ZAF, Republic of South Africa; ZMB, Zambia; ZWE, Zimbabwe (Deu *et al.*, 2006). 38

Table 3-2. Influence of sowing date (June, July and August) on phenological traits and leaf production of the 14 sweet sorghum genotypes cultivated in Bamako, Mali and results of the two-way ANOVAs testing effects of genotype (G) and sowing date (S) on measured traits. Probabilities: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, NS = not significant ($P > 0.05$). Means with the same letter are not statistically different (LSD test) between sowing dates for a given variety and a phenological or morphological trait. 39

Table 3-3. Influence of sowing date (June, July and August) on stem characteristics in the 14 sweet sorghum genotypes cultivated in Bamako, Mali and results of the two-way ANOVAs testing effects of genotype (G) and sowing date (S) on measured traits. Probabilities: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, NS = not significant ($P > 0.05$). Means with the same letter are not statistically different (LSD test) between sowing dates for a given variety and a phenological or morphological trait. 40

Table 3-4. Correlation coefficients between sorghum traits measured at 50% anthesis in June (A) and July (B) sowings in the 14 genotypes cultivated in Sotuba, Mali in 2010. Correlations were not performed for August sowing due to the lack of sugar and dry weight measurements. 41

Table 4-1. Influence of planting date on mean values of grain dry weight per plant, 1000-kernel dry weight and stem structural DW (total stem DW minus sugar content) and stem sugar content at maturity in the 14 sweet sorghum genotypes cultivated in Bamako, Mali and results of the two-way ANOVAs testing effects of genotype (G) and sowing date (S) on measured traits. Probabilities: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, NS = not significant ($P > 0.05$). Means with the same letter are not statistically different (LSD test) between sowing dates for a given variety and a given trait. Underlined grain yields were affected by bird damage and were not used for the analysis in Figure 3. 58

Table 4-2. Correlation coefficients between traits measured at grain maturity in the 14 genotypes in Sotuba, Mali in 2010 in June (A), July (B) and August (C) sowings. DW = dry weight. . SCP = sugar

concentration per plant. SPP = sugar production per plant The percentages of variation in sugar concentration and green leaf dry weights were calculated between anthesis and maturity. A negative percentage indicates a decrease of the values of the trait between anthesis and maturity. Probabilities: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 59

Table 5-1. Mean values \pm SE of some morphological and phenological parameters and results of the two-way ANOVAs testing effects of photoperiod (PP) and line on sterile (SP) and fertile (FP) plants grown in the controlled environments in CIRAD, Montpellier France under 13h- and 12h-PP. Stem dry weight represents both structural and non-structural fractions of the stem. Probabilities: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, NS = not significant. 84

Liste des figures

Figure 1-1. Culture du mil sucré (<i>Pennisetum glaucum</i>) au Québec (photographie : Amélia Bernardes).	4
Figure 3-1. Daily climatic conditions at the Sotuba agronomical station of IER, Mali between the 18 June and the 31 December 2010. On left hand ordinate, Tmin and Tmax: minimal and maximal air temperature, respectively (°C); Rg: global radiation (MJ.m ⁻²); rainfall (mm). On right hand ordinate, photoperiod (h). Black arrows indicate successive sowing dates (S1: 18/6; S2: 12/7; S3: 12/8).....	42
Figure 3-2. Relationship between the sensitivity of abscissa: PhotoSensitive Phase (PSP) duration to photoperiod (PP) at panicle initiation (PSP duration / PP at panicle initiation) and ordinate: phyllochron to PP at germination. Slopes are computed for each genotype using average data at the three sowing dates.	43
Figure 3-3. Stem DW, stem sugar production, stem sugar concentration and plant DW at anthesis in IS3361, a photoperiod-sensitive genotype and IS6351, a less photoperiod-sensitive genotype, cultivated in Sotuba, Mali in 2010 when sown in June (white bars), July (grey bars) and August (black bars). Data are means of four plants ± SE.....	44
Figure 4-1. Sugar composition (glucose, fructose and sucrose) quantified by high performance ionic chromatography with pulsed amperometric detection (HPLC) in juice after stem crushing at grain maturity in six genotypes sown in June (A) and eight genotypes sown in July (B) at Sotuba, Mali in 2010. Data are means of four plants. Plants for the sowing of August were not available.....	61
Figure 4-2. Average value and standard deviation for means of the 14 genotypes studied and for each sowing date (June, July, August) in Sotuba (Mali, 2010) for (left) plant dry weight at maturity, stem sugar concentration (cc) at flowering (FLO) and maturity (MAT) (in mg per g of stem dry weight) and (right) panicle dry weight and plant sugar production at grain maturity. Columns of the same variable carrying the same letter (a, b, c) are not significantly different according to LSD test.	62
Figure 4-3. Estimated sugar concentration at anthesis (grey bars) and grain maturity (black bars) in the stem of the 14 genotypes cultivated in Sotuba, Mali in 2010 when plants were sown in (a) June, (b) July and (c) August. Data are means of four plants ± SE. * indicates that mean values at maturity are significantly different ($p<0.05$) from those at anthesis.	63

Figure 4-4. Relationship between the variation in sugar concentration between anthesis and maturity in the stem (difference in % of sugar concentration at anthesis) and the grain:plant dry weight (DW) ratio (harvest index) in June (closed) and July (open symbols) sowings. Genotypes whose panicle was attacked are not presented. The regression line when both sowing dates are combined is shown on the same figure. 64

Figure 4-5. Sugar concentration estimated at grain maturity in the stem of intact (control) and panicle-pruned plants of the 14 sorghum genotypes cultivated in Sotuba, Mali in 2010 and sown in June (a), July (b) and August (c). Data are means of four plants \pm SE. * indicates that mean values are significantly different ($p < 0.05$). 65

Figure 5-1. Morphology of sorghum stems at the time of sampling for biochemical analyses under 13h- (A) and 12h-PP (B). Numbered internodes where those sampled. Internodes not colored grey are fully elongated. Developmental stages at sampling were flag leaf (FL), anthesis (A), milky grain (MG) and grain maturity (M). Under 13h-PP, samplings were also done at 34 and 26 days before anthesis (DBA) and hard dough stage (HD). 85

Figure 5-2. Effect of photoperiod on sterile (SP) and fertile (FP) plant growth. (A) Time course of the average number of ligulated leaves under 13h-PP (circles) and 12h-PP (triangles) in sterile (open symbols) and fertile (closed symbols) plants. The arrows indicate the phenological stage of 50% anthesis. (B) Average stem (structural fraction) growth kinetics of fertile plants grown under 13h-PP (circles) and 12h-PP (triangles) from sowing to grain maturity. Arrows indicate the stages of onset of stem elongation (E), panicle initiation (PI), flag leaf (FL) and anthesis (A). Dashed arrows characterize the 13h-PP plants. Solid arrows represent the 12h-PP plants. Data are means of four plants \pm SE and originate from plants grown in greenhouse in Montpellier, France. 86

Figure 5-3. Time-course of stem sugar concentrations in sterile (SP) and fertile (FP) plants expressed in thermal time. Concentrations in hexoses (white symbols), sucrose (black symbols) and total sugars (grey symbols) are illustrated for the 13h (A, B; circles) and the 12h (C, D; triangles) photoperiod regime. Sugar accumulation was represented to start from the onset of elongation of the first visible internode. Short and long arrows represent PI and anthesis stages, respectively. Data are means of four plants \pm SE. 87

Figure 5-4. Dynamics of the concentrations in hexoses (white bars), sucrose (black bars) and starch (grey bars) at anthesis (A, C) and grain maturity (B, D) in sterile (SP; A, B) and fertile (FP; C, D) plants grown under 13h-PP. Data are means of four plants \pm SE. 88

Figure 5-5. Time-courses of sucrose concentration in the bottom-most sampled internode in sterile plants (SP), i.e. in internode 15 and 10 in plants grown under 13h- (closed symbols)

and 12h-PP (open symbols), respectively. Data are means of four plants \pm SE and are expressed in thermal time from the onset of its elongation. Arrows represent anthesis stage. 89

Figure 5-6. Total (soluble + starch) sugar content in the stem of sterile and fertile plants (black) and grains of fertile plants (grey) when grown under 13h- (A) and 12h-PP (B). Data are means of four plants. 90

Figure 5-7. Stem, leaves and panicle dry biomass at grain maturity in sterile (SP) and fertile (FP) plants under 13h- (A) and 12h-PP (B), and plant dry biomass gain between anthesis and grain maturity in sterile and fertile plants under 13h- (C) and 12h-PP (D). Data are means of four plants..... 91

Figure 5-8. Time-courses of soluble acid invertase (SAI), sucrose synthase (SS; sucrose synthesis direction) and sucrose-phosphate synthase (SPS) activities, and hexoses, sucrose and starch in internode 17 in sterile (SP; A, C) and fertile (FP; B, D) plants grown under 13h-PP. Internode 17 was in elongation during the first harvest (840°Cd) and elongated thereafter. From harvest 3 (anthesis), E4 is fully expanded. Data are means of four plants \pm SE. Arrows represent anthesis stage. 92

Chapitre 1

Introduction générale

1.1. Le besoin de produire des agrocarburants

Il est maintenant accepté que d'ici les années 2020 les réserves en pétrole seront en majorité déterminées et que la production est vouée à progressivement décliner, probablement autour des années 2020 à 2030, jusqu'à la pénurie d'ici quelques décennies (Jancovici et Grandjean 2006, BP 2007). Cette situation est valable pour le pétrole, qui représentait 34% des énergies fossiles utilisées au milieu des années 2000, mais elle est similaire pour le charbon (24%) et le gaz (21%) qui ne sont pas non plus des ressources infinies. Aussi, depuis plusieurs décennies, des recherches ont été menées sur l'optimisation de l'utilisation des énergies renouvelables (bois, éolien, solaire) et sur la mise au point d'énergies nouvelles (Jancovici et Grandjean 2006). Toutefois les nombreuses contraintes encore liées à l'utilisation de ces énergies, en particulier dans des secteurs très consommateurs comme les transports, obligent à en diversifier les sources d'approvisionnements. Parmi celles-ci, les biocarburants ont fait leur apparition sur le marché.

Les biocarburants, ou agrocarburants, sont produits à grande échelle dans des pays comme le Brésil et les États-Unis, à partir de la canne à sucre pour le premier et de l'amidon provenant des grains de maïs pour le second. Au Brésil, la production de biocarburants est rentable et ils représentent ainsi plus de 20% des carburants utilisés actuellement (Ajanovic, 2011). Toutefois, ceux-ci ont été progressivement contestés et les principaux détracteurs de cette ressource mettent en avant les conséquences de leur utilisation à grande échelle car leur coût (économique, environnemental) est élevé : (i) la production de biomasse pour leur fabrication est polluante (engrais, pesticides) ; (ii) elle fait souvent appel à une agriculture intensive qui nécessite de fortes consommations des ressources en eau (Gheewala *et al.*, 2011) ; (iii) les rendements sont encore faibles ; (iv) leur impact en terme de réduction d'émission des gaz à effet de serre (par substitution du pétrole notamment) est controversée ; (v) enfin, la compétition entre cultures énergétiques et cultures vivrières soulève le problème de la sécurité alimentaire. Cette dernière question est un enjeu d'intérêt majeur au vu du nombre de personnes qui souffrent de malnutrition dans le monde et de la constante augmentation de la population mondiale (Fedoroff and Cohen, 1999). Bien entendu ce problème ne concerne pas uniquement les agrocarburants. L'augmentation de la pauvreté des sols, le régime des pluies très variable (sécheresse en Australie en 2006-2007, sécheresses régulières en Europe ces dernières années, alternances des inondations et des sécheresses comme au Burkina-Faso en 2008) ainsi que les spéculations boursières et leurs aléas ont aussi un impact majeur. Suite à de nombreuses contestations et émeutes (dans les métropoles des pays en voie de développement), la FAO a dû inciter les politiques à la fin de l'année 2008 à réviser leurs programmes de financement et subventions concernant les agrocarburants. Les subventions directes, les coûts indirects (comme les coûts liés au soutien sélectif aux biocarburants) ou encore

l'efficacité des efforts déployés, par exemple, ne permettent pas actuellement d'avoir une production compétitive d'agrocarburants à grande échelle. A la fin des années 2000, le Brésil était le seul pays à avoir une production rentable (FAO, 2008). L'augmentation des prix de l'essence et la raréfaction de la ressource renverseront la tendance dans les prochaines années.

1.2. Les cultures multi-usages

Actuellement, les principales cultures utilisées pour faire des agrocarburants sont la canne à sucre, la betterave, le palmier à huile et le maïs. Toutefois, d'autres espèces comme le jatropha, le mil (*Pennisetum glaucum*) et le sorgho (*Sorghum bicolor*) sont à l'étude. La contrainte principale de la plupart de ces espèces est qu'elles ne sont pas écologiquement (en termes de réduction des gaz à effet de serre et de perte de biodiversité due à l'utilisation de nouvelles terres) ou économiquement rentables (Danielsen *et al.* 2008, Groom *et al.* 2008). Des recherches ont alors été entreprises sur des espèces végétales peu étudiées jusqu'à maintenant comme les algues (Gressel, 2008) ou comme la panic érigé, *switchgrass* en anglais (*Panicum virgatum*) et l'« herbe à éléphants » (*Miscanthus x giganteus*), mais leur potentialité peine à convaincre (Raghu, 2006 ; Reijnders, 2010 ; Cheng et Timilsina, 2011). Une autre solution, alors, était de se pencher sur des espèces utilisées couramment comme cultures vivrières, mais dont les parties qui ne sont pas utilisées pour l'alimentation pourraient être utilisées dans la fabrication d'agrocarburants. Le mil (*Pennisetum glaucum* ; Figure 1.1) et le sorgho (*Sorghum bicolor*) sont deux représentants de ces cultures multi-usages appelées également F-FF-FFF pour food-feed-fuel. Les sorghos, et plus particulièrement les variétés sucrées, sont ainsi une alternative à des espèces cultivées à grande échelle comme la canne à sucre car ils présentent plusieurs avantages : ils sont résistants à la sécheresse et à la chaleur (Steduto *et al.*, 1997 ; Berenguer et Faci, 2001 ; Almodares et Hali, 2009 ; Vasilakoglou *et al.*, 2011) ; ils nécessitent peu d'intrants et ont des cycles de culture relativement courts (3-4 mois) comparés à la canne à sucre (> 9 mois) ; ils présentent une diversité génétique très importante offrant des possibilités d'adaptation à des climats tempérés et tropicaux, ce, tout en étant moins complexes à étudier que la canne à sucre d'un point de vue génétique et morphologique ; ils peuvent être utilisés comme source d'alimentation pour l'homme (grains) ou le bétail (tiges et grains) en plus de la production de jus sucré extrait après pressage des tiges (Berenji & Dahlberg 2004). Certains sorghos expriment de plus le caractère stay-green, un caractère très intéressant pour augmenter la tolérance au déficit hydrique en fin de cycle de culture mais complexe à appréhender (Borrell *et al.*, 2001 ; Hirel *et al.*, 2007 ; Kouressy *et al.*, 2008). Les autres cultures généralement utilisées comme sources de production d'éthanol ou de biodiesel n'ont pas cette polyvalence. Alors que nous sommes dans une période sujette à de nombreuses fluctuations climatiques et que la démarche actuelle est d'éviter toute

compétition pour les terres entre cultures énergétiques et cultures vivrières, le sorgho sucré pourrait être une des cultures « phares » pour le futur.



Figure 1-1. Culture de variétés adaptées de mil sucré (*Pennisetum glaucum*) au Québec (photographie : Amélia Bernardes).

1.3. Le projet européen *Sweetfuel*

Le projet FP7 (SICA) *Sweet sorghum – An alternative energy crop for biofuel production in semi-arid and temperate regions*, d'acronyme *Sweetfuel* (<http://www.sweetfuel-project.eu/>) s'inscrit dans cette thématique de développement de cultures multi-usages. Ce projet, dont le Cirad (Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement) assure la coordination, réunit neufs structures partenaires provenant de sept pays du sud ou du nord : Afrique du Sud, Allemagne, Brésil (Figure 1.2), France, Inde, Italie, Mexique. L'objectif principal de ce projet est d'optimiser la production de biocarburants à partir du sorgho par la sélection de variétés adaptées et l'amélioration des systèmes de culture dans les zones tempérées et dans les zones semi arides tropicales. Une des tâches de ce projet est de développer des variétés optimisant la production de jus sucré et de grains (FFF) dans des environnements tropicaux semi-arides. Ainsi, les recherches menées dans le cadre de *Sweetfuel* devraient permettre d'identifier des idéotypes FF ou



Figure 1-2. (A) Récolte du sorgho sucré à l'aide des machines agricoles dédiées à la canne à sucre et (B) livraison des tiges fractionnées à la distillerie. Expérimentations de l'Embrapa, Brésil (photographies : Serge Braconnier).

FFF adaptés aux environnements tropicaux secs africains (sujets à la sécheresse et où les sols sont pauvres) afin que les agriculteurs locaux bénéficient de variétés combinant à la fois production de grains et teneurs élevées en sucres dans la tige pour la production d'éthanol. De telles variétés permettraient alors de valoriser leur culture et diversifier leurs sources de revenus. Un des axes de

recherche du projet *Sweetfuel* vise à identifier des caractères d'intérêt pour le développement de sorghos sucrés, notamment double usage, à même de maintenir leurs rendements sous conditions de stress hydrique, notamment pour les environnements tropicaux, semi-arides comme l'Afrique de l'Ouest. C'est dans cet axe de recherche que s'est inscrit mon travail de thèse.

1.4. Problématique de la thèse

La littérature concernant les effets des pratiques agricoles ou des conditions climatiques (notamment hydriques) sur les rendements (grains, sucres dans la tige), via l'étude des stratégies d'allocation des ressources dans la plante entre les différents puits, du fonctionnement enzymatique et du stockage des sucres chez le sorgho est relativement riche (Fischer et Wilson, 1971 ; McBee et Miller, 1982 ; McBee *et al.*, 1983 ; Ferraris and Charles-Edwards 1986a,b ; Lingle, 1987 ; Vietor *et al.*, 1989 ; Vietor et Miller, 1990 ; Tarpley *et al.*, 1994 ; Blum *et al.*, 1997). Toutefois, malgré le nombre d'études, certains mécanismes de base ne sont que partiellement définis, conduisant de ce fait à un manque de consensus entre les auteurs. Trois questions, par exemple, restent à ce jour en suspens :

- La première question concerne le moment où débute l'accumulation de glucides dans la tige par rapport à la dynamique développementale de la plante. Celle-ci était considérée comme se produisant après la floraison par plusieurs auteurs (Ventre, 1948 ; Fortmeier et Schubert, 1995 ; McBee et Miller, 1982) mais d'autres ont rapidement remis en cause ce fait (Lingle, 1987 ; Hoffmann-Thoma *et al.*, 1996). Le caractère sucré du sorgho est en réalité un trait complexe. Les rendements en glucides peuvent varier d'une année à l'autre et d'un génotype à l'autre. L'héritabilité (Murray *et al.*, 2009) et les marqueurs biochimiques sont difficiles à caractériser et les interactions génotype x environnement (GxE) chez le sorgho sont très fortes (Chapman *et al.*, 2000; Haussmann *et al.*, 2000 ; DeLacy *et al.*, 2010).

- La seconde touche à la compétition, très peu étudiée, qui pourrait exister entre l'accumulation de glucides dans la tige et le remplissage des grains de la panicule. Ainsi, les compartiments (puits) prioritaires chez le sorgho sont inconnus et nous ne savons pas si la tige n'a qu'un rôle de stockage de surplus de carbone ou bien si c'est un puits à part entière.

- Enfin, le troisième point en suspens concerne les mécanismes physiologiques ou biochimiques sous-jacents à l'accumulation de glucides dans les tiges. Aucun critère n'a encore été établi à ce jour pour distinguer les sorghos sucrés des autres types de sorghos.

Ces questions ont constitué les fondements de la présente thèse.

1.5. Objectifs, approches et plan de la thèse

1.5.1. Objectifs de la thèse

L'objectif général de la présente thèse est d'étudier les bases écophysiologiques, biochimiques et phénologiques de la dynamique d'accumulation des sucres dans la tige du sorgho à l'échelle de la plante entière et de l'organe (entrenœud) ainsi que sa compétition avec le remplissage du grain, afin d'identifier des caractères d'intérêt pour la sélection de variété à double usage sucre (pour le bioalcool) et grains (pour l'alimentation), notamment pour des environnements tropicaux semi-arides. Ce travail doit par là permettre d'améliorer la modélisation des relations source-puits en assimilats carbonés chez le sorgho par une meilleure formalisation des interactions G x E et ainsi permettre l'exploration d'idéotypes variétaux et la prédiction des rendements en sucre et en grains dans un environnement donné. La modélisation *per se* ne fera cependant pas partie de cette thèse, mais du projet Sweetfuel. Les questions de recherche abordées ont été les suivantes :

- 1) Quels sont les mécanismes physiologiques (biochimique, écophysiologique) et morphogénétiques (taille des organes, phénologie de la plante) impliqués dans la répartition des glucides entre leur stockage dans les entrenœuds des tiges et le remplissage des grains de la panicule et leur relative compétition ?
 - a) Les périodes de remplissage des tiges et des grains en glucides se chevauchent-elles (entraînant une compétition directe entre les deux organes puits pour les glucides) ?
 - b) L'un des deux compartiments exerce-t-il une force de puits pour les glucides plus importante que l'autre (compartiment prioritaire) ?
 - c) La panicule fait-elle principalement appel aux assimilats formés après la floraison pour le remplissage du grain, ou puise-t-elle dans les réserves caulinaires ?
- 2) Au sein du panel de génotypes étudiés en serre ou au champ, est-il possible de caractériser une combinaison de comportements morphogénétiques, phénologiques et physiologiques appropriée au contexte agro-écologique ciblé (double rendement, environnement soudano-sahélien sujet aux épisodes de stress hydrique notamment post-floraux) ? En d'autres termes, sommes-nous capables de décrire des idéotypes qui pourraient être pris pour cible par les sélectionneurs ?

1.5.2. Expérimentations et choix des variétés

Trois études au champ ont été réalisées entre 2009 et 2010, au Mali (Figure 1.3) dans les régions de Bamako (à Sotuba) et de Ségou (près du village de Cinzana, 300km au nord-ouest de la

capitale), afin de bénéficier des conditions de culture naturelles des variétés étudiées permettant l'expression de leur potentiel. Ces conditions recherchées étaient d'une part la présence de températures élevées de jour comme de nuit durant 6 à 7 mois (ce qui n'est pas le cas en France métropolitaine car au printemps et à l'automne les nuits sont fraîches), afin que les variétés les plus tardives puissent terminer leur cycle de développement, et d'autre part l'arrêt des pluies à la fin du mois de septembre afin de bénéficier d'une période sèche post-florale pour l'induction d'un stress hydrique. Ces expérimentations au Mali ont été rendues possibles grâce aux structures des stations agronomiques de l'IER, l'Institut d'Économie Rurale (Figures 1.3C, D). En parallèle, deux études en serre ont été menées au Cirad à Montpellier, en France, afin de disposer de moyens techniques auxquels nous n'avions pas accès sur le terrain pour des mesures d'échanges gazeux, de dosage des glucides par chromatographie et des mesures d'activités enzymatiques.

Les variétés (« landrace ») que nous avons étudiées proviennent de la *core collection* du Cirad (Deu *et al.*, 2006), une collection de 210 accessions qui représentent la diversité génétique de la collection mondiale de sorgho détenue par l'ICRISAT (Grenier *et al.*, 2001a, b), l'*International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics*, qui compte plus de 35000 accessions. Ce choix nous a permis de bénéficier des données d'essais conduits par les chercheurs du Cirad depuis sa création, indispensables à la réalisation de notre projet car nous avons pu ainsi nous affranchir d'une phase de phénotypage qui aurait été extrêmement chronophage. En réalisant des expériences en serre et sur le terrain, en France et en Afrique, où nous devions faire face à des périodes de déficit hydrique, les contraintes quant au choix des variétés étaient multiples. Nos variétés devaient être sucrées mais aussi, idéalement, contrastées en termes de sensibilité à la photopériode, de biomasse de tige, de nombre d'entrenœuds, de rendement en grains, de durée de cycle (durée de la phase végétative) et de jutosité de la tige afin de représenter la diversité existante. La sensibilité à la photopériode était un trait essentiel dans les présentes études car il a permis d'exploiter son potentiel en conditions soudano-sahéliennes ; certaines variétés devaient cependant pouvoir fleurir lors de nos essais en France. La première année, deux autres caractères ont été aussi pris en considération, le *stay-green* et la précocité. Concernant le *stay-green*, la difficulté à le mesurer sur le terrain nous l'a fait abandonner dès la fin de la première expérience. La précocité nous permettait, en calculant la date de semis, d'assurer le remplissage du grain au cours d'une période sans précipitations. Enfin, l'idéal était également de travailler, sans toutefois écarter complètement la diversité génétique propre à cette espèce, sur des variétés possédant un fond génétique similaire. Cette démarche permettait de ne pas se disperser en favorisant des mécanismes proches d'élaboration des réserves glucidiques (J. Chantreau, communication personnelle).

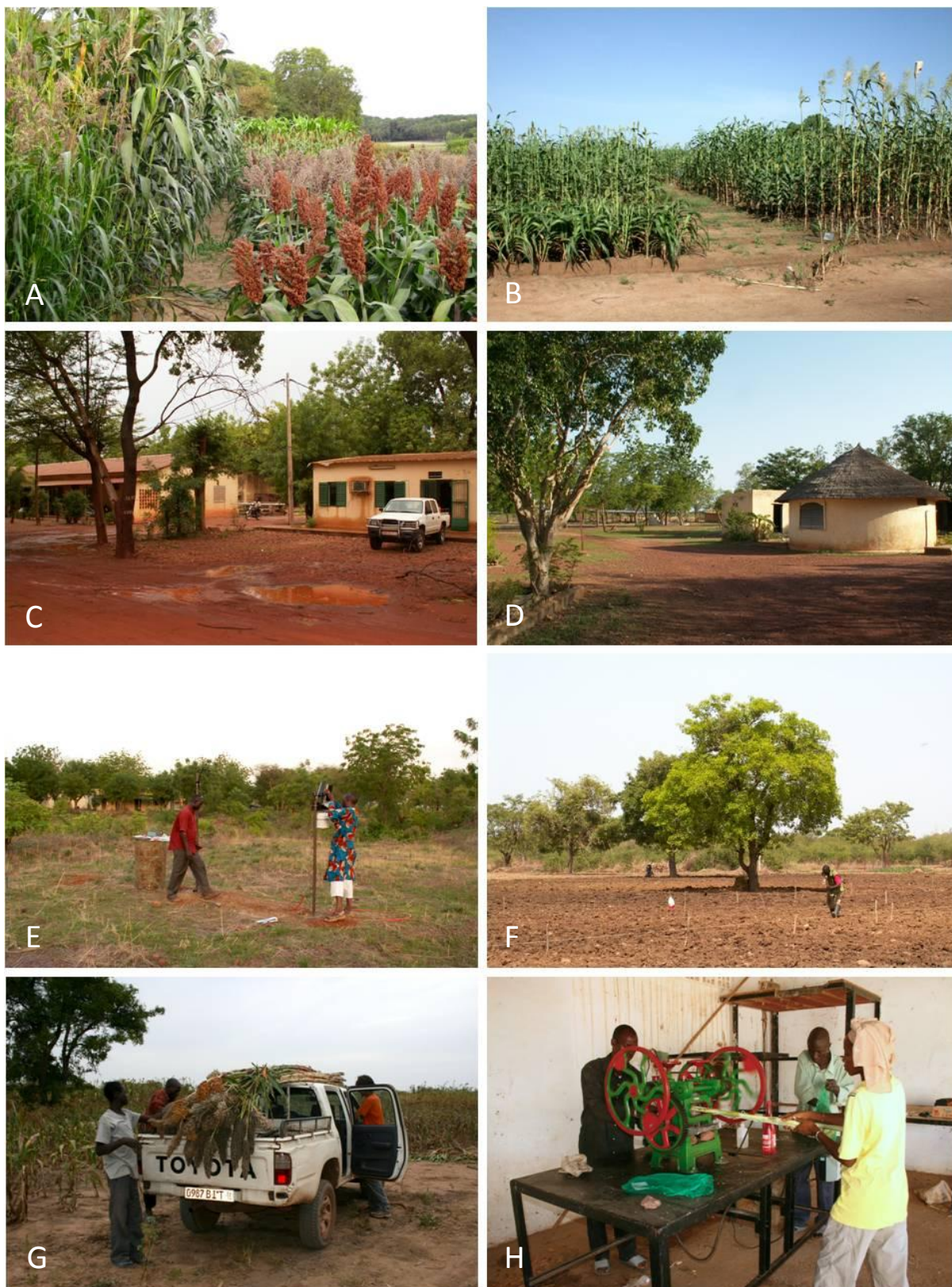


Figure 1-3. Illustration de la diversité phénotypique rencontrée chez le sorgho (A) dans une parcelle cultivée à Montpellier et (B) dans notre essai de 2009 à Cinzana au Mali. (C) Stations agronomiques de l'IER (Mali) à Sotuba, près de Bamako et (D) de Cinzana, plus au nord. (E) Installation de la station météorologique à Cinzana par le Dr Mamoutou Kouressy (à droite) et son assistant Mahamady Kané. (F) Semis des variétés, (G) transport des tiges pour le pressage et (H) pressage de ces tiges au cours de l'essai mené à Cinzana en 2009.

1.5.3. Plan de la thèse

Une revue de la littérature décrivant notre plante d'étude, le sorgho, puis abordant les questions des relations sources-puits dans les plantes, ainsi que le stockage des glucides dans la tige chez les variétés sucrières, en s'attardant sur le sorgho sucré est présentée dans le chapitre suivant (**chapitre 2**). Les chapitres 3 et 4 présentent les résultats d'un essai au champ (Mali) où 14 variétés de sorgho capables de stocker des concentrations élevées de glucides dans la tige ont été semées à un mois d'intervalle en juin, juillet et août. Nous avons tout d'abord évalué la production de glucides dans les tiges à floraison et abordé les relations entre ce trait et la croissance des plantes en réponse aux dates de semis (photopériodisme) (**chapitre 3**). Le **chapitre 4** focalise sur le devenir des glucides accumulés avant floraison et s'attarde sur les relations entre la production de sucres, la production de biomasse et la production de grains. La cinétique d'accumulation des glucides à l'échelle des entrenœuds est finalement étudiée dans le **chapitre 5**. Il est également question dans ce chapitre des processus enzymatiques associés à ce stockage de glucides, mais aussi de sa compétition potentielle avec le remplissage du grain, en fonction des réserves accumulées avant floraison. Nos résultats sont discutés dans le **chapitre 6**. Les aspects liés à la réponse de nos variétés aux stress hydriques ne seront pas abordés dans ce mémoire mais seront valorisés par ailleurs.

Chapitre 2

Revue de littérature

2.1. Le sorgho

2.1.1. Le genre *Sorghum*

Le sorgho (*Sorghum bicolor* [L.] Moench) est une herbacée appartenant à la famille des Poacées (graminées). C'est une plante de type C_4 comme la canne à sucre et le maïs. Le genre *Sorghum* est divisé en cinq sections (Doggett, 1988). Parmi elle se trouve la section *Sorghum*, composée de deux espèces sauvages et pérennes, *S. propinquum* (diploïde, $2n=20$) et *S. halepense* (tetraploïde, $2n=40$) ainsi que d'une espèce annuelle, *S. bicolor* (diploïde, $2n=20$). L'espèce *S. bicolor* est elle-même divisée en trois sous-espèces. La sous-espèce *S. bicolor* spp. *bicolor*, inclut les sorghos cultivés au sein desquels cinq races principales sont distinguées, les caudatum, les durra, les guinea, les kafir et les bicolor. Cette classification, proposée par Harlan et de Wet (1972), est basée sur des critères morphologiques des épillets (glumelles et grains) et sur la forme de la panicule : en plus des cinq races principales, elle définit 10 types intermédiaires qui représentent la combinaison des cinq races deux à deux (Chantereau *et al.*, 1997). Les deux autres sous-espèces de *S. bicolor* sont *S. bicolor* spp. *drummondii* (sorghos adventices) et *S. bicolor* spp. *verticilliflorum* (sorghos sauvages).

2.1.2. Biologie du sorgho

Comme chez toute espèce de la famille des poacées, le sorgho est constitué d'un appareil racinaire en majorité souterrain et d'organes aériens dont l'architecture est formée par un empilement d'unités analogues appelées phytomères. Les phytomères sont des unités constituées d'un nœud, d'un entrenœud, d'une feuille particulière divisée en deux parties (la gaine et le limbe) et d'un bourgeon axillaire situé à l'aisselle de cette feuille. Ce dernier est capable de donner naissance à un nouveau brin, la talle, qui sera elle-même composée de phytomères et qui sera capable de fleurir et produire des grains sous certaines conditions (Lafarge *et al.*, 2002 ; Kim, 2008). L'inflorescence est terminale, possède une forme variable suivant la race et la variété et est issue du passage du méristème apical d'un état végétatif à un état reproducteur. Le sorgho est une plante autogame, où la fécondation anémophile est facilitée par le fait que, contrairement au maïs, les fleurs sont hermaphrodites.

Selon Vanderlip et Reeves (1972), le développement du sorgho peut être résumé en dix étapes. Lorsque la plante est en phase végétative, au cours des trois premiers stades de croissance selon les auteurs, elle arbore un port tassé où la rigidité de la plante provient de l'empilement des gaines des feuilles. L'appareil racinaire est bien développé et des racines adventives peuvent apparaître pour fixer la plante au sol, en particulier chez les variétés de grande taille. Ce caractère est important pour éviter les phénomènes de verse en fin de saison. Au stade 3, le potentiel de développement de la plante est établi. Le méristème apical perd son caractère végétatif et fait place

à la production de l'inflorescence ; c'est l'initiation paniculaire. Le nombre d'entrenœuds est déterminé et l'élongation rapide de la tige débute à ce stade. Au stade 4, la feuille drapeau (la dernière feuille) apparaît dans le cône. Au stade 5 (*boot stage*), l'élongation des feuilles est terminée et la surface foliaire est maximale. La tige atteint sa taille finale dès la finalisation de l'élongation du pédoncule. Le stade 6 correspond à la période de floraison, et les stades 7 et 8 au remplissage du grain. Le stade 9, appelé maturité physiologique, est le stade où le grain peut être récolté. L'humidité très variable du grain à ce stade ne peut servir de critère pour déterminer la maturité de la plante (Vanderlip et Reeves HE, 1972). La sénescence de la plante n'est pas non plus un indicateur fiable. En effet, malgré le caractère annuel de l'espèce, le sorgho cultivé ne démontre pas le patron de sénescence typique des espèces monocarpiques. Chez ces dernières la reproduction est généralement caractérisée par une phase simple précédant la mort de l'individu. La sénescence est alors considérée comme le résultat d'un épuisement consécutif à la reproduction, la plus grande partie des ressources se trouvant dans la plante étant exportée dans les graines et les fruits. Cette relation de cause à effet entre la reproduction et la sénescence est confirmée chez de nombreuses espèces (Nooden et Leopold, 1988). Mais certaines comme *Arabidopsis* ne semblent pas suivre ce patron (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2003), et c'est le cas pour les sorghos que nous avons étudié. Le moyen le plus fiable pour déterminer le stade de maturité physiologique consistait donc à surveiller l'apparition d'un point noir sur le grain, au niveau du hile.

L'étude de Vanderlip et Reeves HE (1972) est une référence dans la littérature portant sur le développement du sorgho. Il faut toutefois noter qu'il ne fait pas effet de la grande diversité retrouvée parmi les sorghos, ni de l'effet de la sensibilité à la photopériode (cf. section 2.1.4). Les définitions des stades ne sont donc pas toujours transposables aux cycles de croissance observés en Afrique. Certaines variétés peuvent en effet atteindre plus de 5 mètres de hauteur et les cycles peuvent varier de 80-90 jours pour les variétés les plus précoces à 6-8 mois pour les plus tardives sensibles à la photopériode. Dans le cas des variétés photopériodiques, une désynchronisation entre initiation paniculaire et élongation de la tige se produit généralement. Le schéma de sénescence des feuilles n'est plus non plus respecté.

2.1.3. La culture du sorgho en Afrique de l'Ouest

Le sorgho a une origine africaine mais sa grande diversité génétique et phénotypique en fait une espèce d'intérêt majeur cultivée de part le monde. En 2010, comme lors des dix années précédentes, il représentait la cinquième céréale cultivée dans le monde après le maïs, le riz, le blé et l'orge (FAOSTAT, 2011). En Afrique, les sorghos sont cultivés dans une gamme variée d'environnements du nord au sud du continent. Le sorgho est cependant cultivé majoritairement en

Afrique de l'Ouest, dans le nord de l'Afrique Centrale et en Afrique de l'Est dans des pays comme le Burkina Faso, le Mali, l'Ethiopie, le Nigéria, le Soudan, la Tanzanie et l'Egypte (FAOSTAT, 2011). Le sorgho représente la seconde espèce la plus cultivée en Afrique subsaharienne et l'espèce la plus cultivée en zone sahélienne. Cette culture, comme celle d'autres céréales traditionnelles comme le mil, s'est toutefois retrouvée marginalisée suite à l'intensification des pratiques agricoles (utilisation d'intrants) liée à la culture du coton. Dans le Sud du Mali, la production de sorgho a reculé au profit du maïs qui fournit de meilleurs rendements ; on le retrouve alors dans des zones moins fertiles (Bazile et Soumaré, 2008). Cependant, sa grande résistance à la sécheresse en fait une culture que le maïs ne peut supplanter dans les zones où les précipitations sont faibles ou irrégulières lorsque les cultures ne sont pas irriguées. Dans notre région d'étude au Mali, les paysans travaillent la terre après les premières pluies en mai et juin et sèment lors des pluies suivantes. Les cultures réalisent alors leur cycle végétatif pendant la saison des pluies et grâce aux réserves en eau du sol dans le cas des variétés de cycle long. La faible mécanisation des paysans et l'absence, très souvent, de systèmes d'irrigation font que les paysans sont fidèles à leurs variétés. Celles plus productives, issues des nouveaux programmes de sélection, ont alors du mal à être adoptées (Kouressy *et al.*, 2008). Une forte diversité agromorphologique semble également favorisée dans les villages, possiblement pour répondre aux diverses pratiques culturelles et à la diversité des sols (Barro-Kondombo *et al.*, 2008).

2.1.4. *Le rôle du photopériodisme dans la culture du sorgho*

Le photopériodisme est un terme créé en 1920 pour caractériser la réponse des plantes à la photopériode, c'est-à-dire à la durée d'exposition journalière à la lumière (Garner and Allard, 1920). Ce phénomène permet ainsi de caractériser de nombreuses observations réalisées à la fin du 19^{ème} et début du 20^{ème} siècle qui montraient que les phases de croissance végétative et de reproduction des plantes pouvaient être manipulées sous l'influence du contrôle des facteurs environnementaux. Les expériences qui ont suivi ont alors montré que les espèces pouvaient être classées en trois types : les plantes de jours courts, les plantes de jours longs et les plantes indifférentes à la durée du jour (Harvey, 1922). D'autres types ont été rapportés par la suite, comme les espèces intermédiaires et ambiphotopériodiques qui fleurissent uniquement lors de photopériodes particulières (Thomas et Vince-Prue, 1997).

Cette capacité des plantes à répondre aux modifications de leur environnement fut décrite comme un facteur déterminant pour leur distribution naturelle. Les espèces ont ainsi su adapter leur biologie et particulièrement leur reproduction aux variations naturelles de photopériode dans leur milieu d'origine pour se caler sur la saison la plus favorable à leur survie (Murneek, 1948). Dans le cas du sorgho, toutes les variétés ne sont pas photopériodiques, mais celles cultivées par les paysans en

Afrique le sont souvent car ce caractère adaptatif permet aux variétés locales de synchroniser leur floraison à la fin de la saison des pluies (Curtis, 1968 ; Kouressy *et al.*, 2005 ; Kouressy *et al.*, 2008) car celle-ci s'avère assez stable entre les années (Traoré *et al.*, 2000). Ainsi, une variété photopériodique fleurira à la même période peu importe la date de semis et plus cette date sera tardive, plus l'initiation paniculaire se produira rapidement (Andrews, 1973 ; Muchow and Carberry, 1990 ; Clerget *et al.*, 2008b). Cette stratégie permet alors aux grains de mûrir en période sèche, qui dans notre région d'étude au Mali, commence entre fin septembre et début octobre. Le développement de moisissures est ainsi réduit. En termes de croissance, le photopériodisme se traduit par une modification du développement et de l'architecture des plantes (Clerget *et al.*, 2004, 2008a, b ; Vaksman, 2008) ; plus les semis sont tardifs, plus la hauteur des plantes sera réduite (Figure 2.1). Cette réduction de taille découle directement de la réduction du nombre de phytomères produits (Clerget *et al.*, 2008b), mais rarement de leur taille (Bezot, 1963 ; Clerget *et al.*, 2008b).



Figure 2-1. Illustration de la réponse d'une variété photopériodique, ici IS8685, à l'effet de date de semis (Sotuba, 2010). De gauche à droite, les plantes ont été semées respectivement en juin, juillet et août.

2.1.5. Les sorghos sucrés

Au sein des sorghos, il existe des variétés recherchées pour les caractères sucré et juteux de leur tige. Ces variétés, appelées sorghos sucrés, furent au cours de l'histoire respectivement déterminées comme *Holcus saccharatus* (L.), *Andropogon saccharatus* (R.) et *Sorghum saccharatum* (Pers.) à la fin du XIX^{ème} siècle, avant d'être finalement classées au sein des *S. bicolor*. Les variétés sucrées sont représentées parmi les cinq races de sorgho ; toutefois, l'étude de Ritter *et al.* (2007) a souligné le lien direct qui existe entre l'origine raciale des variétés sucrées et les programmes de sélection. Ainsi, alors que Ritter et ses collaborateurs ont noté que la majorité de leurs variétés étaient des kafir, celles de Seetharama *et al.* (1987) étaient principalement des caudatum. Dans le premier cas, les variétés étaient issues de programmes de sélection américains basés sur du matériel d'origine sud-africaine où les kafir sont prédominants ; dans le second cas, les caudatum étaient originaires d'Afrique de l'Est.

C'est à la suite de la découverte des variétés sucrées que l'introduction des sorghos aurait eu lieu dans les pays occidentaux. En France, les premiers sorghos sucrés ont été introduits en 1851, après que M. de Montigny, consul de France à Shanghai (Chine) ait envoyé des graines à la Société de géographie de Paris (Joulie, 1864). Le sorgho sucré avait alors à l'époque le nom de canne à sucre du nord de la Chine. Cette espèce semblait idéale dans un but de production sucrière car elle représentait une culture intermédiaire entre la canne à sucre (*Saccharum* spp [L.]), qui nécessite un climat chaud et humide qui n'est pas rencontré en France métropolitaine, et la betterave à sucre, qui ne donnent de bons rendements que dans les environnements frais comme dans le nord de la France. Aux Etats-Unis, des introductions de graines ont eu lieu entre les années 1854 et 1863. Mais c'est en 1867 que 16 variétés sucrées (« saccharine varieties ») provenant d'Afrique du Sud et ramenées par un commerçant anglais nommé M. Leonard Wray ont été cultivées pour la première fois dans ce pays (Swanson et Laude, 1934). L'arrivée des variétés à grains en occident serait postérieure à ces introductions.

Les sorghos sucrés sont cultivés en Afrique de l'Ouest dans bon nombre de villages. Toutefois leur production reste souvent marginale, en particulier au Mali, car ils ne sont cultivés que pour le plaisir de les déguster comme sucrerie (Figure 2.2A). Il n'est pas rare alors d'observer quand vient le temps de la floraison la vente de tiges sur le bord des routes. Ces variétés sont souvent semées au milieu de parcelles d'autres variétés de sorgho (cultivées pour le grain) ou même de parcelles d'autres cultures comme le mil (*Pennisetum glaucum* [L.] R. Br.) à l'abri des passages des enfants (Figure 2.2B). Ces derniers recherchent en effet activement ces variétés avant qu'elles n'arrivent à maturité pour mâcher les tiges dont le goût sucré est de plus en plus prononcé au fur et à mesure de la croissance du grain. Le fait de cacher ses variétés permet alors d'étaler la récolte dans le temps.



Figure 2-2. (A) Dégustation de tiges de sorghos sucrés fraîchement récoltées par les enfants d'un village des environs de Cinzana. (B) Sorghos sucrés (au premier plan) cultivés en plein milieu d'une parcelle de mil à Berthela par les paysans afin que les enfants ne puissent pas les localiser, et ainsi les récolter.

Les variétés sucrées ont été intégrées dans de nombreux programmes de sélection et des études ont été menées pour tenter d'élucider ce phénomène d'accumulation de glucides dans les tiges. Les principales études traitant de ce sujet ont eu lieu à partir des années 70. Une revue de littérature la plus exhaustive possible est proposée dans les sections 2.3.2 et 2.3.3 un peu plus loin dans ce chapitre. Cependant, en dépit du fait que les variétés sucrées ont toutes en commun d'être grandes et de produire une biomasse importante, d'être juteuses et d'accumuler des quantités importantes de glucides dans les tiges (Balole, 2001 ; Ritter, 2007 ; Makanda, 200 ; Murray *et al.*, 2009), il n'existe actuellement aucun marqueur biochimique ou moléculaire ni même de critère de

seuil de concentration en glucides dans les tiges pour distinguer les sorghos sucrés des autres types de sorghos (Murray *et al.*, 2009).

2.1.6. *Le sorgho, une culture multi-usage*

La sélection chez le sorgho a une histoire récente comparée à d'autres cultures céréalières comme le blé, le maïs ou le riz. L'érosion génétique est de plus considérablement freinée en Afrique (Deu *et al.*, 2010) grâce à la tradition des paysans de maintenir la culture de plusieurs variétés dans leurs champs. Ainsi, la variabilité phénotypique élevée chez cette espèce permet son utilisation pour des usages très divers : les grains sont utilisés pour la préparation de plats traditionnels, comme le tô au Mali, ou de bière (dolo, ou tchapalo) et pour nourrir le bétail ; les tiges et les feuilles sont utilisées comme fourrage ou comme matériau pour les habitations ; le rachis très long et lâche des sorghos à balais est utilisé pour la fabrication, comme son nom le suggère, de balais ; le jus riche en sucres obtenu après pressage des tiges des variétés favorisant l'accumulation de monosaccharides (glucose, etc.) est utilisé pour la production de sirop (semblable au sirop d'érable) et celles favorisant l'accumulation de sucres cristallisables comme le saccharose sont utilisées pour la production de sucres ; les tiges des mêmes variétés sont utilisées comme sucrerie où elles sont mâchées après avoir enlevé l'épiderme lignifié (Doggett, 1988 ; Rooney et Waniska, 2000). Le grain de sorgho est encore peu utilisé pour l'alimentation humaine dans les pays occidentaux mais sa faible teneur en gluten en fait un aliment particulièrement intéressant pour les personnes qui y sont allergiques (Dicko *et al.*, 2006 ; Medeiros *et al.*, 2011)

L'intérêt de cette espèce réside alors dans le fait que les usages que nous venons d'énumérer font intervenir des organes différents de la plante. Ainsi, le développement de variétés combinant de façon optimale la production de grains et le stockage de glucides dans la tige permettrait aux paysans des pays du sud de valoriser leur culture et diversifier leurs sources de revenus. Les grains, par exemple, peuvent être exploités pour l'alimentation et/ou le commerce, les feuilles pour le fourrage et enfin les tiges pour l'extraction ou la fermentation du jus, afin de les utiliser comme engrais verts, comme fourrages ou pour la production de carburants. Dans le cas d'un emploi comme source de carburant, les techniques mises au point de nos jours se résument à l'utilisation des jus sucrés des tiges en vue d'une fermentation qui mène à la synthèse d'éthanol (comme chez la canne à sucre). Mais d'ici quelques années, les techniques de production des agrocarburants de deuxième génération devraient voir le jour et toute la plante pourra être utilisée.

2.2. Métabolisme des glucides et relations sources-puits de carbone chez les plantes supérieures

2.2.1. La fixation du carbone dans les feuilles

Les plantes supérieures sont caractérisées, en règle générale, par leur autotrophie carbonée, c'est-à-dire leur capacité à fixer le carbone (C) présent dans l'air ambiant sous forme de dioxyde de carbone (CO_2) pour le transformer en molécules carbonées organiques. Ces dernières peuvent alors être utilisées pour le métabolisme de la plante, c'est-à-dire pour les processus de développement et de croissance des différents organes la composant. Ces molécules carbonées synthétisées grâce à l'énergie lumineuse au cours de la photosynthèse sont des glucides. A la suite de leur synthèse au niveau des organes photosynthétiques, le plus souvent les feuilles, ils sont exportés dans toute la plante à travers le système circulatoire de la sève élaborée, ou phloème. Les éléments complémentaires au bon déroulement du métabolisme, que sont l'eau et les éléments minéraux, sont quant à eux assimilés au niveau du système racinaire et redistribués dans la plante à travers le système circulatoire de la sève brute, ou xylème.

Chez les plantes supérieures, l'assimilation du CO_2 atmosphérique présent dans les lacunes des feuilles et arrivé par diffusion à travers les stomates se déroule au niveau des chloroplastes des cellules chlorophylliennes. Ce CO_2 est incorporé grâce à la ribulose-1,5-diphosphate carboxylase/oxygénase (Rubisco) dans le cycle de Calvin-Benson. Au cours de ce cycle se produit une série de réactions biochimiques nécessitant (« phase claire ») ou pas (« phase sombre ») la présence de lumière où le CO_2 est réduit pour être incorporé à une molécule à 5 carbones, le ribulose-1,5-diphosphate (RuDP) présente dans le chloroplaste. Il s'en suivra la formation de composés à 3 carbones (acide 3-phosphoglycérique) puis la réduction de cet acide en trioses-phosphate (trioses-P ; glucide) et enfin le recyclage du ribulose bisphosphate après plus d'une dizaine de réactions biochimiques. Les trioses-P ainsi formés sont par la suite transférés dans le cytoplasme des cellules chlorophylliennes via des transporteurs. Ils serviront soit à la respiration mitochondriale pour produire de l'énergie (ATP), soit à la synthèse de saccharose avant son exportation vers les autres organes de la plante et d'amidon (stockage) chez certaines espèces.

Dans le cas des graminées en C_4 comme le sorgho, le maïs ou la canne à sucre, le processus de photosynthèse comporte quelques spécificités et étapes supplémentaires. Le CO_2 est préalablement fixé au niveau des cellules du mésophylle pour ensuite être transporté dans les cellules de la gaine fasciculaire où se dérouleront les réactions du cycle de Calvin-Benson telles que présentées précédemment. Dans le cytosol des cellules du mésophylle le CO_2 se retrouve incorporé par la phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) à un acide organique, le phosphoenolpyruvate, permettant ainsi de former de l'oxaloacetate (OAA). Ce dernier converti en malate (dans le cas des espèces du

type NADPME comme le sorgho, le maïs et la canne à sucre) est transporté dans les cellules de la gaine fasciculaire pour y être décarboxylé, re-libérant ainsi la molécule de dioxyde de carbone qui sera fixée par la rubisco. Cette voie photosynthétique est considérée comme une adaptation à la croissance aux milieux secs car il permet de concentrer le CO₂ dans les cellules pourvues de rubisco afin de poursuivre la photosynthèse lorsque les stomates ne sont plus que complètement ouverts pour limiter les pertes en eau par transpiration. Cette voie permet de limiter le phénomène de photorespiration en minimisant l'activité oxygénase de la rubisco.

2.2.2. Sources et puits de C chez les plantes supérieures

D'un point de vue physiologique on retrouve au sein d'une même plante deux types d'organes. Certains sont capables de photosynthétiser et leur bilan carboné est positif, c'est-à-dire que la quantité de glucides synthétisée est supérieure à celle qui est consommée soit pour la croissance soit pour le métabolisme de base (respiration de maintien). Les autres organes ne sont pas capables de faire de la photosynthèse et sont donc dépourvus de pigments photosynthétiques, ou bien possèdent de tels pigments mais leur bilan carboné est négatif. La respiration y est plus importante que l'assimilation, c'est le cas typique d'un organe photosynthétique en croissance. On parle alors d'organe source de C dans le cas d'un bilan positif (excédentaire) de C et d'organe puits de C lorsque le bilan carboné est négatif. Les organes puits de C sont généralement les organes végétatifs (tiges, racines, jeunes feuilles, bourgeons), les organes reproducteurs (fleurs, fruits) et les organes de réserve (bulbes, rhizomes, racines et tubercules). Les organes sources de C chez les plantes sont principalement les feuilles matures, mais dans le cas des graminées, l'architecture de la plante composée de feuilles engainantes chlorophylliennes permettant son port vertical fait que toute la plante participe à l'assimilation carbonée (Goldsworthy, 1970a). D'autres organes, comme les organes de réserve en début de saison de croissance, les tiges par exemple chez les cactacées, mais également les racines aériennes (Benzing *et al.*, 1983) ou encore lors de leur premier stade de développement les pièces florales ou les fruits (Bazzaz *et al.*, 1979; Ben Mokhtar et Houle, 2005 ; Marcelis et Baan Hofman-Eijer, 2006 ; Vaillant-Gaveau *et al.*, 2011) ou la panicule chez les graminées (Evans and Rawson, 1970 ; Fisher et Wilson, 1971b), peuvent représenter des sources non négligeables de C pour le développement. Ainsi, selon le stade phénologique de la plante, les puits de C et leur force peuvent varier car les produits de la photosynthèse sont exportés suivant un flux bidirectionnel qui est fonction de l'importance du gradient présent entre les différents organes de la plante. L'allocation des assimilats des sources vers les différents puits suit alors un schéma d'offre et de demande. Un puits est alors caractérisé par sa force, c'est-à-dire par son activité et sa taille

(Marcelis, 1996) et plus cette force du puits est importante, et donc plus la demande est élevée, plus les ressources qui lui sont allouées sont importantes.

2.2.3. *Synthèse et exportation du saccharose*

Lorsque les trioses-P nouvellement synthétisés dans les chloroplastes sont destinés à la production puis l'exportation de glucides vers les organes puits, ceux-ci sont métabolisés en saccharose dans le cytoplasme des cellules chlorophylliennes via les réactions catalysées par la fructose biphosphate aldolase (formation de fructose biphosphate), la fructose biphosphatase (formation de fructose-6P, l'un des deux précurseurs du saccharose-6P), la phosphoglucose isomérase (formation de glucose-6P), la phosphoglucomutase (formation de glucose-1P), l'UDP-glucose pyrophosphorylase (formation d'UDP-glucose, l'autre précurseur du saccharose-6P), la saccharose phosphate synthase (formation de saccharose-6P) et la saccharose phosphatase. Le saccharose est alors soit exporté soit hydrolysé en hexoses (glucose et fructose) qui pourront être recyclés en saccharose à partir des hexoses-P résultants des réactions catalysées par l'hexokinase et la fructokinase.

Le saccharose, qui est le principal glucide exporté chez les plantes supérieures (Lunn and Furbank, 1999) passe alors du cytoplasme des cellules chlorophylliennes du mésophylle (Lunn and Furbank, 1997) et de la gaine péri-vasculaire chez les plantes de type C_4 pour se retrouver fortement concentré, en particulier chez les espèces sucrières (Lohaus *et al.* 1994), dans la sève phloémienne (Fig. XX). L'arrivée de saccharose en forte concentration dans les tubes criblés du phloème crée alors une différence de pression osmotique qui entraîne à son tour une entrée d'eau dans les tubes criblés. Le phénomène inverse se produira lorsque le saccharose passera des tubes criblés aux cellules des puits. Le flux de sève, qui est bidirectionnel dans le cas du phloème, suit ainsi un flux de masse dicté par le gradient de pression de turgescence au sein de la plante (Münch, 1930 ; Williams *et al.*, 2000).

Le transport du saccharose a fait l'objet de plusieurs études chez les espèces saccharifères dans le but de mieux comprendre les étapes qui pouvaient être limitantes dans le processus de stockage. Il a ainsi été montré chez la canne à sucre que ce transport combinait très probablement un transport apoplasmique au niveau des feuilles lors du chargement du phloème (Rae *et al.*, 2005a) pour palier le manque de connections entre les cellules de la feuille et celles du phloème, puis un transport apoplasmique et symplasmique lors du déchargement au niveau des puits (Lingle, 1989 ; Rae *et al.*, 2005a, b). La voie apoplasmique serait alors un des moyens pour la plante de stocker des glucides tout en maintenant le flux de sève pour en accumuler davantage ; la voie symplasmique, quant à elle, serait nécessaire pour faciliter les échanges à cause de l'épaisseur des parois

(lignification) des cellules des faisceaux conducteurs. Chez le sorgho sucré, ce sujet a été moins étudié, mais Tarpley *et al.* (1996) et Tarpley et Vietor (2007) ont montré que lors du transport des feuilles aux puits, au cours de la maturation des tiges, le saccharose était transporté par voie apoplasmique et très peu hydrolysé (et resynthétisé en arrivant dans les cellules puits). La voie symplasmique était toutefois la voie préférentielle des talles en expansion (Tarpley et Vietor, 2007).

2.3. Le métabolisme des glucides chez le sorgho

2.3.1. Mise en place des réserves C chez le sorgho

Le stockage de glucides dans les organes aériens est commun chez les graminées (Archbold, 1945 ; Weng *et al.*, 1982 ; Schnyder, 1993). Des concentrations élevées de glucides sont naturellement rapportées chez des plantes sucrières comme la canne à sucre et le sorgho sucré. Ce stockage a lieu principalement dans la tige chez le blé, le maïs et le sorgho, et au niveau des feuilles, et particulièrement dans les gaines, chez le riz. Chez les graminées, la mise en place de réserve est généralement considérée comme un phénomène passif qui résulte d'un stockage du surplus d'assimilats causé par une activité des sources (feuilles) supérieure à celle des puits (tige et panicule). Ce phénomène se produit lorsque la surface foliaire est maximale, particulièrement en fin de cycle végétatif lorsque que l'élongation de la tige est achevée et que les organes reproducteurs ne sont pas encore un puits assez fort (Lingle, 1987 ; Girardin, 2000).

Chez le sorgho, nombreuses sont les études abordant les questions des effets des pratiques agricoles (date et densité de semis, fertilisation) sur les rendements, l'allocation des ressources (suppression des sources et des puits), l'impact du stress hydrique sur la production de biomasse et le remplissage du grain, ainsi que le stockage des glucides dans les variétés sucrées et à grains et le fonctionnement enzymatique associé (Fischer et Wilson, 1971 ; McBee et Miller, 1982 ; McBee *et al.*, 1983 ; Ferraris et Charles-Edwards, 1986a,b ; Lingle, 1987 ; Vietor *et al.*, 1989 ; Vietor et Miller, 1990 ; Tarpley *et al.*, 1994 ; Hoffmann-Thoma *et al.*, 1996 ; Blum *et al.*, 1997 ; Anglani, 1998). En dépit de ces études, deux questions fondamentales restent en suspens : (i) à quel moment du développement de la plante débute le remplissage des tiges en sucres, et (ii) quels sont les mécanismes physiologiques et biochimiques (particulièrement enzymatiques) mis en jeu à ce stade. McBee *et al.* (1983), Vietor *et al.* (1989) et Vietor et Miller (1990) ont concentré leurs efforts dans les stades suivants la floraison, donc leurs résultats ne permettent pas de faire des comparaisons entre phase végétative et phase reproductrice. McBee et Miller (1982), Ferraris et Charles-Edwards (1986), Lingle (1987), Fortmeier et Schubert (1995) et Hoffmann-Thoma *et al.* (1996) ont pris en compte la phase végétative dans leurs études. Mais tandis que Fortmeier et Schubert (1995) considèrent que

l'accumulation de sucres dans les tiges débute après la floraison, dans les trois autres études cette accumulation débuterait lorsque les feuilles ont atteint leur surface foliaire maximale (*Boot stage* en anglais), c'est-à-dire après la phase d'initiation paniculaire mais avant la floraison. Nous constatons cependant que d'une part les études comparent rarement plusieurs génotypes, ou pas nécessairement les mêmes (d'où la difficulté de synthétiser les résultats présentés), et d'autre part que les analyses n'intègrent malheureusement pas des mesures réalisées au cours de toute la saison de croissance des plantes, c'est-à-dire aussi bien pendant la phase végétative que pendant la phase de formation et de remplissage des grains. Dans leur étude, Hoffmann-Thoma *et al.* (1996) ont également montré que la stratégie d'accumulation des sucres était variable suivant les génotypes étudiés. Deux des génotypes étudiés, Keller et NK 405, accumulaient des sucres en concentration élevée tout le long de la tige ; le génotype Tracy, qui était aussi un sorgho sucré, accumulait la majorité des sucres dans les entrenœuds situés au milieu de la tige.

2.3.2. Remobilisation des réserves C chez le sorgho

Le stockage de glucides chez les graminées est un processus transitoire. Dans une moindre mesure le développement de la panicule mais surtout le remplissage du grain nécessitent un apport important de saccharose qui sera transformé par la suite sous la forme préférentielle de stockage selon l'espèce considérée. Si la phase de reproduction fait intervenir majoritairement des assimilats produits après la floraison (Stickler et Pauli, 1961 ; Thorne, 1965 ; Goldsworthy, 1970), une partie des réserves pré-florales participe au remplissage du grain (Archbold, 1945 ; Schnyder, 1993). Les études ne s'accordent pas sur la valeur de cette remobilisation car elle dépend largement de la méthode de calcul (Archbold, 1945 ; Wardlaw et Porter, 1967 ; Kiniry *et al.*, 1992 ; Bidinger *et al.*, 1977) mais celle-ci se trouverait aux alentours des 10-20%. Une valeur de 12% a été avancée par Fisher et Wilson (1971a) chez le sorgho. Cette remobilisation, qui reste faible tant que les conditions de croissance ne sont pas limitantes, devient cependant beaucoup plus conséquente lorsque les sources ne peuvent plus palier à la demande des puits. Les cas de remobilisation sont ainsi particulièrement fréquents en cas de conditions environnementales affectant le processus de photosynthèse comme lors d'un stress hydrique (Gallagher *et al.*, 1976 ; Blum *et al.*, 1997 ; Blum, 1998 ; Foulkes *et al.*, 2007).

Chez le sorgho sucré, parce que de nombreuses variétés étudiées avaient des petites panicules, le caractère sucré était décrit comme la conséquence d'une faible force de puits exercée par les grains au moment du remplissage (Goldsworthy, 1970; Lingle, 1987). Cette explication n'est cependant pas la bonne car il est possible de trouver dans les champs de paysans africains des variétés sucrées qui possèdent de grosses panicules. Des concentrations en saccharose plus faibles sont aussi retrouvées dans les entrenœuds les plus jeunes par rapport au reste de la tige (Lingle,

1987 ; Hoffmann-Thoma *et al.* 1996), ce qui prouve une certaine compétition entre la tige et la panicule pour les assimilats. Cette observation est appuyée par les expériences de marquage au ^{14}C de Vietor et Miller (1990) qui soulignent la remobilisation des sucres des tiges en cas de besoin chez le sorgho sucré. Fortmeier et Schubert (1995), en comparant des lignées stériles et fertiles de deux cultivars, ont confirmé une potentielle compétition entre le remplissage des tiges et de la panicule. Pour un des deux génotypes étudiés, la concentration en saccharose dans les tiges des individus stériles est plus élevée que dans celles de leur équivalent fertile. La compétition entre la tige et la panicule fut confirmée par certaines études (Broadhead, 1973 ; Ferraris, 1981) et infirmée par d'autres (Rajendran *et al.*, 2000). Ces résultats soulèvent la question de la séquence d'évènements morpho-physiologiques (biochimiques) composant le passage (ou le chevauchement) entre remplissage des puits constitués par les entrenœuds et les panicules.

2.3.3. Le métabolisme du saccharose dans la tige

Les voies de synthèse du saccharose ont été très étudiées chez la canne à sucre puis chez les variétés sucrées de sorgho car elles représentent un intérêt majeur dans la course à la productivité, le but étant d'obtenir des plantes qui produisent toujours plus, soit pour l'industrie sucrière, soit pour la production de biocarburants. La canne à sucre est la variété la plus étudiée car les enjeux sont considérables pour cette culture. Il a ainsi été établi chez cette espèce que l'accumulation de saccharose dans les cellules de la tige résulte d'une baisse de l'activité saccharolytique d'enzymes telles que les invertases et la saccharose synthase (dans le sens du clivage) qui sont très actives pendant l'élongation des entrenœuds en faveur d'enzymes responsables de sa formation, telles que la saccharose phosphate synthase (Zhu *et al.*, 1997 ; Lingle, 1999 ; Botha et Black, 2000).

Des études récentes ont cependant montré que les progrès apportés par les programmes de sélection étaient de plus en plus faibles (Grof et Campbell, 2001 ; Jackson, 2005). Les chercheurs se sont donc tournés vers le sorgho sucré dont le génome moins complexe pourrait permettre de mieux cerner les mécanismes mis en jeu (Ritter *et al.*, 2004). Le rôle de la saccharose synthase (Susy), des invertases soluble et pariétale, de la saccharose phosphate synthase (SPS) et de la saccharose phosphate phosphatase (SPP) chez cette espèce ont donc fait l'objet de nouvelles études. L'implication de certaines de ces enzymes dans les mécanismes d'accumulation des glucides a été en grande partie identifiée mais pour d'autres leur interaction reste encore obscure. La Susy, par exemple, a été détectée (sens clivage du saccharose) dans les jeunes entre-nœuds encore en croissance et qui nécessitait donc des hexoses pour la synthèse des parois cellulaires et pour l'apport d'énergie ; Lingle (1987) remarque alors que l'accumulation des glucides dans les tiges coïncidait avec une diminution de l'activité de cette enzyme et de l'invertase acide soluble dans ce même

organe. Tarpley *et al.* (1994) considéraient que la diminution de l'activité de ces deux enzymes était un prérequis à l'accumulation de sucres. Hoffmann-Thoma *et al.* (1996) n'ont cependant pas retrouvé la présence d'invertases dans les génotypes qu'ils ont étudiés. La SPS, qui est une enzyme responsable de la synthèse du saccharose chez les plantes, a été retrouvée dans les tiges et les feuilles de sorgho, et son activité était constante au cours de la croissance des organes (Hoffmann-Thoma *et al.* 1996). Cependant, dans les tiges, aucune corrélation entre l'activité de cette enzyme et l'augmentation de sucres n'a pu être mise en évidence, contrairement à la canne à sucre. Dans les feuilles, au contraire, la SPS est présente de façon significative. En particulier dans les feuilles complètement développées. Enfin, en ce qui concerne la SPP, comme pour la SPS, aucune corrélation entre l'activité de cette enzyme et l'augmentation en saccharose n'a été mise en évidence. Toutefois cette enzyme n'a été étudiée que par Hoffmann-Thoma *et al.* (1996).

Chapitre 3

Grain, sugar and biomass accumulation in photoperiod-sensitive sorghums. I. Effects of variable phyllochron and earliness on plant structure at flowering

3.1. Abstract

Sweet sorghums can both produce grains and large sugar reserves in stems. Their adaptation to dry and hot environments makes them a promising target for development of multi-purpose crops for the tropics. Objectives of higher biomass and sugar yield stimulate interest in phenology and photoperiod (PP) sensitivity in particular. This paper investigates effects of contrasting phenological and morphological traits on plant structure and sugar accumulation at flowering in response to sowing for 14 genotypes.

Fourteen contrasting, sweet sorghum genotypes were cultivated near Bamako (Mali) at three sowing dates under field conditions with supplemental irrigation. Observations of phenology (duration to flowering, phyllochron), morphology (including number and dimensions of internodes) and sugar accumulation in stems (derived from Brix, tissue moisture content and dry matter) were performed to identify traits contributing to sugar accumulation at anthesis.

Late sowing (associated with shorter days) led to a dramatic decrease in total leaf number, plant height, dry mass and sugar accumulation even in PP-insensitive genotypes in terms of flowering response. PP-sensitive plants had stable phyllochron whereas in PP-insensitive plants, phyllochron increased and leaf number decreased for late sowing dates. Dry matter accumulation was strongly correlated with leaf number and thus driven by phenology. Sugar accumulation at anthesis followed stem dry matter because sugar concentration varied little. High stem moisture was associated with high sugar concentration. No significant trade-offs between dry matter and sugar accumulation was observed.

Traits favoring sugar production in the 14 genotypes investigated at flowering across sowing dates were late flowering, moderate PP-sensitivity, stable phyllochron, thick internodes and stem moisture. Brix values are a poor indicator of stem sugar concentration because of variable dilution by moisture content. Further research is needed on interactions of these traits with cultural practices and drought. A companion paper addresses trade-offs between sugar accumulation and grain filling.

3.2. Introduction

Biofuels may be a viable alternative to fossil fuels (Hill *et al.*, 2006). First generation biofuels derived from sugars (sucrose or starch) and oils use only a fraction of the plant material but second-generation technologies using the entire plant (including ligno-cellulosics) are not yet a viable option. Biofuel plants providing sugar and starch, however, necessarily occupy environments suitable for staple food production and may compete with it. Global population will attain 9 billion by 2050, thus

dramatically increasing demand for food (Fedoroff and Cohen, 1999). To avoid or reduce competition for land and water between food and 1st generation biofuel crops, especially in developing countries, multi-purpose Food-Feed-Fuel (FFF) crops must be explored.

De Vries *et al.* (2010) compared nine oil palm, maize, wheat, sweet sorghum, sugarcane, sugar beet, cassava, rapeseed and soybean, with regards to their potential productivity and ecological sustainability for 1st generation biofuel production. Sweet sorghum, which stores soluble sugars in stems, were considered to be among the best options. Sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] is the second most cultivated cereal crop in Sub-Saharan and ranks first in the semi-arid Sahel (FAOSTAT, 2011). It is primarily a grain crop but the entire plant can be used as forage, and the press sap from stems of sweet varieties can be used for syrup, sugar production or direct consumption (Doggett, 1988). Compared to sugarcane, sweet sorghums have the advantage of potentially providing three high-value products: grain, sugar and forage. Sorghum is drought and heat resistant and thus better adapted to dry and variable climatic conditions and low input cropping situations as found in West Africa (Nasidi *et al.*, 2010).

In Africa, sorghum production is primarily rainfed and farmers generally use photoperiod (PP) sensitive varieties, which enable variable sowing date while flowering during the optimal period at the end of the rainy season (Curtis, 1968; Traoré *et al.*, 2007). This trait, which results in extremely variable crop duration and thus plant height and biomass, is vital for maintaining low but stable grain yields as the onset date of the rainy season varies (Kouressy *et al.*, 2008a, b). It also helps avoid bird damage and grain mold. For non-grain uses of the crop, PP sensitivity is of interest because late maturity increases the vegetative biomass, and potentially, stem storage capacity for sugars.

Understanding carbohydrate (C) partitioning to the different compartments in sweet sorghum varieties is important because trade-offs are likely among grain, sugar and biomass production, probably requiring specific breeding investment. Sink-source and sink-sink interactions are poorly known in sweet, PP-sensitive sorghums. A potential negative interaction between stem development and grain yield was suggested by Clerget (2008). Distribution of C among plant organs and especially among maintenance and growth processes was suggested to limit grain yield (Goldsworthy, 1970; Goldsworthy and Taylor, 1970). Competition for C between grain filling and storage in stems was reported by Ferraris (1981), Fortmeier and Schubert (1995) and Rajendran *et al.* (2000). The importance of this competition, however, is controversial (Broadhead, 1973; Fortmeier and Schubert, 1995).

The present research aims to study the genotype by environment (GxE) interactions and physiological trade-offs affecting sugar, biomass and grain yields, in sweet, PP-sensitive sorghums in

the field (first two sequels) and in the greenhouse (last sequel). These interactions are expected to be strong because PP-sensitive sorghums show extreme phenotypic and phenological plasticity (Kouressy *et al.*, 2008a). The study is part of the European project Sweetfuel (<http://www.sweet-fuel-project.eu>) that aims at developing sweet sorghum ideotypes for ethanol production for different cropping systems and ecosystems, in particular FFF cultivars for semi-arid tropical regions. The field experiments conducted in Mali makes use of different sowing dates and panicle pruning to generate phenotypic plasticity, whereas the greenhouse study (sequel 3) uses genetic male sterility to study stem sugar accumulation in the presence or absence of a grain sink. The objective of the present sequel was to quantify the impact of planting dates on vegetative growth, stem sugar concentration and stem sugar production (dry weight) at anthesis for 14 contrasting genotypes. The estimation of the amount of carbohydrates stored in the stem at this stage is essential to apprehend reserve mobilization during grain filling, and to optimize source-sink relationships for dual purpose sorghums.

3.3. Materials and methods

3.3.1. Plant material

Fourteen contrasted sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] accessions were chosen among the 210 accessions of the CIRAD sorghum core collection (Deu *et al.*, 2006). This core collection provides a world-wide representation of cultivated landraces of sorghum, with sampling based on geographical origin (in particular latitude), race classification, photoperiod sensitivity and mode of cultivation. It derives from a stratification sampling exercise from the ICRISAT sorghum collection conducted by Grenier *et al.* (2001a, b), afterwards complemented (enriched) with landraces from typical sorghum groups of Western and Central Africa (guinea gambicum, margaritifera, muskwari), identified from prior studies on genetic diversity and taken from the CIRAD sorghum collection (Deu *et al.*, 2006). The fourteen genotypes used in our study were all landraces, selected from available data sets to contrast for phenology (duration of the vegetative phase), photoperiod sensitivity, plant height, phytomer number, grain yield and brix (soluble solids) values. The description and the geographical origin of the 14 evaluated accessions are found in Table 3.1.

3.3.2. Study site and experimental design

The experiment was conducted at the Sotuba agronomical research station of IER (Institut d'Economie Rural) near Bamako, Mali (12°39'N; 7°56'W). The site has a typical climate of the West African Sudan savannah characterized by two contrasted seasons: a rainy season from early June late September (October) and a dry season (without rains) at other times. Mean annual rainfall during the

past 30 years (1970-2010) is 891 mm and were ca. 1180 mm during the year of our experiment. The soil layer is an acid, ferric and slightly hydromorphic silty sand composed of 75% sand, 20% silt and 5% clay and 55% sand, 25% silt and 20% clay at 0-20 cm and 20-80 cm, respectively (Kouressy *et al.*, 2008a).

Genotypes were tested in a randomized block design with three replications. Each experimental plot was four 3.60 m-long rows, with spacing of 0.75 m between rows and 0.40 m between hills on each row. Each elemental plot consisted of more plants than necessary to consider plants in the middle and avoid border effect. Sorghum was also cultivated around the trial to attract birds and limit attack within the trial. Sowing was hand made by putting ten seeds per hill, then thinned to one plant per hill three weeks after emergence. Tillers were marginal and removed when appearing to avoid competition with main stem and focus on the genotypic capacity to store sucrose in the stem. The trial was repeated with three sowing dates: 18 June, 12 July and 12 August 2010 after the soil was supplied with 150 kg.ha⁻¹ ammonium phosphate (DAP 18-46-0-0). Urea was applied at a dose of 150 kg.ha⁻¹ during vegetative growth. Weeds were removed by hand regularly during the first month of growth. Average daily thermal and radiation conditions are presented in Figure 3.1.

3.3.3. *Plant growth measurements*

In each plot, four plants were randomly chosen at thinning time for phenological observations and total leaf number counting (leaves were regularly numbered with a marker). These plants were harvested at grain maturity (detailed in the next companion paper). Four other plants were sampled at anthesis for measuring the biomass components and brix values. Harvest at anthesis was limited at four genotypes for August sowing due to the loss of too many plants per plot because of pathogens and a low rate of seedling emergence. Thus, some data analyses for August sowing are not presented here. Fresh weight (FW) and dry weight (DW) of green leaves (blade), stems (and sheaths) and panicles were determined on the basis of four plants. Dry weight was estimated after a first drying of fresh biomass at sun followed by a 48h period in an oven at 70°C. Plant height, stem length (with and without the peduncle) and median diameter and the number of elongated internodes were measured at maturity. Mean internode length was calculated by dividing stem length without peduncle by the number of elongated internodes.

3.3.4. *Phyllochron and thermal time (TT) calculation*

Thermal time (TT) at flag leaf was calculated as the difference between mean daily temperature and a base temperature of 10.8°C (Lafarge and Tardieu, 2002). Flag leaf stage was defined as the time when flag leaf was fully expanded, i.e. when the ligula was visible. A global

phyllochron (here defined as the thermal time interval between the visual appearance of two successive ligules) was computed by dividing the total leaf number by the thermal time between seedling emergence and flag leaf stages.

The developmental and phenological sensitivity of studied genotypes to PP was investigated in terms of phyllochron and vegetative phase duration, respectively. For each genotype, the slope of the linear regression between phyllochron (°Cd) and photoperiod (PP) at germination on one hand and between photosensitive phase (PSP) duration (in °Cd) and PP at panicle initiation were computed. PSP value of all varieties in August was zero, thus representing the minimum duration of the vegetative phase".

3.3.5. Sugar quantification

Brix measurements were performed with a hand-held refractometer (Atago Co. Ltd) on the juice of the four stems after crushing in a three-roll sorghum press (ICRISAT). Juice weight and volume were measured and one milliliter of juice of six and eight genotypes in June and July respectively was sampled and stored at -20°C prior to assay. Sugar concentration in juice was quantified by high performance ionic chromatography with pulsed amperometric detection (Dionex system) in Montpellier, France. Following this, the slope of the regression line passing through the origin between the brix and the real sugar concentration (g per litre of juice) values was determined. Then, estimated sugar content (g) and sugar concentration (mg.g⁻¹ DW) and content (g) of sugars in the stem were calculated as follow:

$$\text{Sugar content (g)} = \text{Brix} \times 8.8272 \times \frac{(\text{Stem FW} - \text{Stem DW})}{1000}$$

$$\text{Sugar concentration (mg.g}^{-1}\text{ DW)} = \frac{\text{Sugar content}}{\text{Stem DW}} \times 1000$$

where 8.8272 = slope of the regression line between brix and sugar concentration in grams per litre of juice.

3.3.6. Data analysis

All statistical analyses were performed using SAS 9.2 (SAS Institute, Cary, NC, USA). Two-way ANOVAs with genotype (G) and sowing date (S), followed by a posteriori multiple comparisons of means using Fisher's LSD tests, were performed on the variables thermal time to flag leaf, phyllochron, plant height, stem DW, internode number and length and median stem diameter. Because of the small number of experimental units, the assumptions of homogeneity of variance and

normality were not met. The proc RANK was then used. Matrices of correlation and multiple linear regressions were performed with SAS PROC CORR and PROC REG, respectively. A critical value of $\alpha=0.05$ was used for the tests of significance.

3.4. Results

3.4.1. *Effect of sowing date on plant growth and phenology*

Sowing date and genotype highly significantly ($P<0.0001$) affected the phenological and morphological crop variables observed, as well as the Brix values at anthesis (Tables 3.2 and 3.3). Sowing date x genotype (S x G) interactions were also highly significant ($p<0.0001$) except for stem diameter ($p<0.05$). Mean duration across genotypes from sowing to flag leaf stage was 85 d (1310 °C.d) for sowing in June, 76 d (1166 °C.d) for July and 71 d (1092 °C.d) for August. It varied strongly with a decreasing trend for late maturing genotypes (e.g., IS33261: 136, 117 and 100 d) but varied little or with an increasing trend for early maturing genotypes (IS2848: 55, 59 and 65 d, respectively). These changes in phenology were associated with decreasing day length from June to August, whereas temperature varied little (Figure 3.1).

Mean phyllochron of the genotypes increased from 45.9 to 60.9 °C.d between June and August sowings (Table 3.2). This increase was significant ($P<0.05$) in all but two genotypes. It was more pronounced from July to August (+9.5 °C.d on average) than from June to July (+5.5 °C.d).

Plant height (measured at maturity) generally decreased as plants were sown later, and this was associated with a dramatic reduction in stem DW at the same stage (on average, -75 % between June and August), even in genotypes that did not show a reduction in growth duration. This was mainly due to a strong reduction of elongated internode number (-49 %) and to a lesser degree to smaller stem diameter (-27 %) and smaller average length of internodes (-9 %) (Table 3.3). Internode length significantly ($P<0.05$) decreased in only four genotypes between June and August and in one genotype between June and July sowings. Internode number and thickness were thus more plastic than length.

Total leaf number per stem on average decreased by 37 % from June (28.3) to August (17.8) sowing. A significant decrease ($P<0.05$) was observed in all genotypes regardless of whether their crop duration varied or not.

3.4.2. Relationship of growth duration and phyllochron with day length

Based on the observation that genotypes having strong variation in time to flowering had comparatively stable phyllochron and *vice versa* (Table 3.2), and the hypothesis of a common photoperiod related cause, we tried to relate flowering and phyllochron responses to each other (Figure 3.2). Responses were considered as the slope of the linear regression across three sowing dates between the phenological variable and day length. The phenological variables were duration of photoperiod sensitive phase (PSP) and phyllochron. We thereby assumed that the effective day length signal for end of PSP occurs at panicle initiation and that for phyllochron at germination, because phyllochron is present from onset of plant development.

Based on this analysis (Figure 3.2), two contrasted types of phenological response to sowing date were observed. Three genotypes (IS23142, IS8685 and IS33261) exhibited a strong response of vegetative phase duration but a fairly response of phyllochron; and six genotypes (IS2848, IS10234, IS20351, IS26731, IS6351 and IS2814) showed strong response of phyllochron but weak response of vegetative phase duration. The five other genotypes (IS5867, IS23254, IS26833, IS15443 and SSM215) showed an intermediate response.

Both the negative response of vegetative phase duration to sowing date in photoperiod-sensitive genotypes and the positive response of phyllochron to sowing date in photoperiod-insensitive genotypes (in terms of flowering) contributed to the observed, dramatic reduction on leaf number when sowing was delayed (Table 3.2). The two responses were expressed differentially among genotypes in an opposing pattern (Fig. 3.2). In all cases, the result was decreased phytomer, and thus leaf number per culm for late sowings. Total leaf number, in turn, was highly correlated across genotypes and environments with stem dry weight and stem total sugar content as calculated from Brix values (in both cases: $R = 0.94$, $P < 0.001$; Table 3.4). Consequently, there was a direct effect of phenological plasticity of the genotypes on biomass and sugar accumulation at anthesis.

3.4.3. Sugar storage in internodes at anthesis

Across genotypes, mean sugar concentration in press sap, as indicated by Brix values at anthesis in internodes, was significantly affected by sowing date (only June and July considered because data was incomplete for August), genotype and date x genotype interaction ($P < 0.0001$) (Table 3.2). Brix values increased ($P < 0.05$) from June to July in two genotypes (IS2814, SSM 215) but decreased in six genotypes (IS5867, IS6351, IS8685, IS23142, IS23254, IS26833). Too few observations were made to establish trends between July and August, but overall variation of Brix values at anthesis among sowing dates was small as compared to that of the morphological variables.

Figure 3.3 demonstrates the biomass dependency of sugar accumulation for a late-maturing, highly photoperiod-sensitive Caudatum genotype having stable phyllochron (IS33261) and a less photoperiod-sensitive, late-maturing Durra genotype having highly variable phyllochron (IS6351). In the photoperiod-sensitive plant, estimated stem CH₂O per plant dropped in August to only 7% of the value observed for sowing in June. In the nearly photoperiod-insensitive plant, it dropped less dramatically to 30%. This effect was caused pre-dominantly by variation of stem DW whereas the estimated CH₂O concentration in the internodes remained comparatively high even in August. In fact, IS33261 stood out from the genotype panel by having the longest duration to flowering at all sowing dates while having constant phyllochron, and by having the tallest phenotype for all sowing dates while having the highest leaf number (Table 3.2). It also produced the highest elongated internode number, thickest internodes, greatest stem dry weight and greatest sugar content, whereas it had comparatively short internodes (Table 3.3).

3.4.4. Relationships among variables observed at anthesis

Correlation matrices among observed variables at anthesis gave similar patterns for June and July sowings (Table 3.4). Very high, positive correlations ($R > 0.9$, $P < 0.001$) were observed for June sowing among the following variables (Table 3.4): Thermal time from sowing to flag leaf stage, Total leaf number at anthesis, stem dry weight at anthesis and absolute stem sugar content at anthesis. These variables were also positively, although less strongly, correlated with green leaf dry weight at anthesis. Correlations were similar for July sowing.

Brix values and stem sugar concentration had fewer and weaker correlations with morphological variables. They were not correlated with absolute sugar content, because sugar content was driven by variation in dry matter whereas sugar concentration varied comparatively little. Stem moisture content, which is an essential variable to estimate tissue sugar concentration from Brix, was negatively correlated with green leaf dry weight ($P < 0.01$ in June and $P < 0.05$ in July).

3.5. Discussion

3.5.1. Phenology is a driver of dry matter and sugar accumulation in sweet sorghum

The genotypes studied here were sweet sorghums achieving similar stem sugar concentration at anthesis (Brix at about 12°) but having different phenology and morphology. This translated into large genotypic differences in dry matter and sugar accumulation. Phenology was the main driver of the strong observed effects of sowing date on dry matter and sugar accumulation. Phenology of sorghum, in turn, has as major sources of variability (1) time to flowering, which is strongly affected

by day length in photoperiod-sensitive genotypes (Muchow and Carberry, 1990, Clerget *et al.*, 2004; Dingkuhn *et al.*, 2008); and (2) by variability in organogenetic development rate in terms of plastochron and phyllochron. The latter is known to depend largely on temperature (Muchow and Carberry, 1990; Craufurd and Qi, 2001) but Clerget *et al.* (2008) demonstrated that temperature-adjusted rate of phytomer and leaf production in sorghum also responds to sowing date, most likely through day length effects.

The present results present an interesting phenomenon that has to our knowledge not been reported previously. Genotypes having strong plasticity of time to flowering (which we interpret here as a classical sensitivity to photoperiod) had low plasticity in phyllochron, whereas genotypes showing photoperiod-insensitivity of flowering date had highly variable phyllochron among sowing dates. Intermediate types had intermediate variability of both time to flowering and phyllochron. As a consequence of the two phenological responses, which may be physiologically or genetically linked by unknown mechanisms, late sowing led to a dramatic reduction in leaf and internode number, and probably by consequence, to reduced plant height and biomass and sugar accumulation at flowering.

Negative effects on growth of late sowing, unrelated to water or other resources, were reported by Bezot (1963), Miller *et al.* (1968), Clerget *et al.* (2008) and Kouressy *et al.* (2008a). According to our results, this growth reduction is mainly related to organ number (leaves, internodes), to a lesser degree to stem thickness and hardly at all to internode length. This confirmed Bezot (1963) who suggested also that internode length was the most invariable trait across sowing dates. Effects on sugar accumulation at anthesis thereby are more related to the size of the storage compartment (dry matter of stems) than to concentration.

3.5.2. *Trade-offs between structural vs. non-structural biomass and stem moisture content*

Makanda *et al.* (2009) reported negative correlations of Brix values and the number of days to anthesis, plant height and stem diameter, but not with stem dry mass. According to our results, Brix values of stem press juice had no consistent relationship with any morphological or phenological variable observed, but Brix was negatively correlated with stem moisture. This can probably be explained with a dilution effect. It also demonstrates the limited information Brix values *per se* obtained on press juice provide on sugar content of tissues. Stem moisture content was positively correlated with tissue sugar concentration at flowering, indicating that moisture content is an important determinant of sugar accumulation.

Highest Brix values (or sugar concentration in the press juice) are generally measured in white-midrib genotypes (Doggett, 1988) because they can have low juice yields, the sugars being concentrated in a small juice volume. As a result, while these genotypes are often considered as

sweet, they have low sugar yields. In contrast, lower sugar concentrations are observed in green-midrib genotypes (Doggett, 1988) because of sugar dilution in the greater volume of juice. However, a large fraction of the juice is also present in nodes, especially if they are large and numerous. As a result, the genotype with the greatest mean juice weight in June and July was IS33261, a white-midrib genotype. An optimum between sugar concentration and juice volume may thus be identified and selected for.

Sugars in the sorghum stem are mainly transported through an apoplastic path and to a lesser extent by symplast in ripening culms (Tarpley and Vietor, 2007). The pith tissues of sorghum internodes have more variable water content than the rind, and low moisture content may cause low sugar storage and mobilization potential in the vacuoles of the pith aerenchyma. The negative correlation observed among genotypes for stem moisture content vs. green leaf dry weight, however, is difficult to explain. In fact, internode tissue sugar concentration also correlated negatively with green leaf biomass per plant at anthesis. Total leaf number (including senescent leaves) was not significantly correlated with stem moisture content, Brix or sugar concentration. If low green leaf biomass is interpreted as being an indicator of low senescence, we would rather expect a positive correlation between leaf biomass and stem water content. Jahn *et al.* (2011) suggested that selecting for reduced water content in rice may increase plant total biomass. Whether trade-offs exist in sorghum between green leaf maintenance (pre-floral stay-green) and sugar accumulation thus requires further studies.

No trade-offs (in terms of negative correlations) were observed between dry matter accumulation and stem tissue sugar concentration, and consequently, any effects of phenology (variation in time to flowering and phyllochron) on growth translated directly into sugar accumulation in stems.

3.5.3. *Traits contributing to high dry matter and sugar accumulation at anthesis*

If the phenology and morphology of the most productive genotype on the panel studied here is any indication (IS33261), greatest biomass and sugar accumulation across the different sowing dates is achieved with long duration to flowering, moderate photoperiod sensitivity of flowering, stable phyllochron, short but thick internodes and above-average Brix values and stem tissue sugar concentration. These traits gave IS33261 an advantage over all other genotypes, but they constitute a plant type that is very different from current breeding objectives for grain sorghum in West Africa (Dingkuhn *et al.*, 2006), which aim at short stature, combined with either photoperiod sensitivity or insensitivity depending on the targeted system. This result remains preliminary, however, because plant type interactions with cultural practices (namely, population density) and water and nutrient

resources remain to be studied. This study's companion paper will investigate traits and trade-offs related to dry matter, sugar and grain yield during the post-flowering phases of development.

Table 3-1. Geographical origin, racial classification, plant height, photoperiod (PP) sensitivity and duration of the complete growth cycle of the 14 accessions of the CIRAD sorghum core collection (Montpellier) evaluated in Bamako, Mali in 2010. CAF, Central African Republic; CMR, Cameroon; ETH, Ethiopia; IND, India; NER, Niger; SDN, Sudan; TZA, Tanzania; ZAF, Republic of South Africa; ZMB, Zambia; ZWE, Zimbabwe (Deu *et al.*, 2006).

Accession number	Geographical origin	Racial classification	Plant height ^a	Photoperiod (PP) sensitivity	Cycle duration ^b
IS 2814	ZWE	Caudatum	Short	Low	Medium
IS 2848	ZAF	Caudatum	Short	Low	Early
IS 5867	IND	Durra-Caudatum	Medium	Low	Medium
IS 6351	IND	Durra	Tall	Low	Late
IS 8685	SDN	Caudatum	Tall	High	Late
IS 10234	CAF	Caudatum	Medium-Tall	Moderate	Medium
IS 15443	CMR	Caudatum	Tall	Moderate	Medium
IS 20351	NER	Durra	Tall	Low	Medium
IS 23142	TZA	Durra	Tall	High	Late
IS 23254	ZMB	Bicolor	Tall	High	Late
IS 26731	ZAF	Bicolor	Tall	Low	Early
IS 26833	SDN	Caudatum	Medium	Moderate	Medium
IS 33261	CMR	Caudatum	Tall	High	Late
SSM 215	ETH	Caudatum	Short	Low	Medium

^a short: < 2m; medium: from 2 to 3m; tall: > 3m in Mali conditions with June planting.

^b early: < 70 days; medium: from 70 to 110 days; late > 110 days in Mali conditions with June planting.

Table 3-2. Influence of sowing date (June, July and August) on phenological traits and leaf production of the 14 sweet sorghum genotypes cultivated in Bamako, Mali and results of the two-way ANOVAs testing effects of genotype (G) and sowing date (S) on measured traits. Probabilities: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, NS = not significant ($P > 0.05$). Means with the same letter are not statistically different (LSD test) between sowing dates for a given variety and a phenological or morphological trait.

Accession number	Thermal time to flag leaf (°Cd)			Phyllochron (°Cd.leaf ¹)			Plant height at maturity (cm)			Total leaf number at flowering		
	June	July	August	June	July	August	June	July	August	June	July	August
IS 2814	1024a	951b	943b	40b	44b	63a	175a	153ab	122b	25.6a	21.4b	15.0c
IS 2848	796b	799b	943a	38c	54b	67a	187a	154b	128b	20.8a	14.9b	14.0b
IS 5867	1262a	1029b	909c	53ab	50b	55a	319a	311a	191b	23.9a	20.6b	16.5c
IS 6351	1411a	1451a	1322a	48b	63a	69a	369a	293b	173c	29.6a	23.3b	19.3c
IS 8685	1667a	1406b	1124c	51b	56a	54ab	356a	309b	222c	33.0a	25.2b	20.8c
IS 10234	1141a	977b	955b	44b	46b	61a	252a	199b	135c	25.8a	21.4b	15.6c
IS 15443	1054a	1006a	891b	38b	43b	53a	381a	330b	178c	27.5a	23.8b	16.8c
IS 20351	1061a	924b	1004a	42b	45b	72a	362a	314b	188c	25.3a	20.8b	14.0c
IS 23142	1971a	1587a	1373b	50b	55a	n/a	413a	374b	237c	39.4a	29.3b	25.7c
IS 23254	1649a	1323b	1204c	52b	57a	61a	405a	362b	223c	31.7a	23.4b	19.5c
IS 26731	801b	832b	978a	48c	57b	73a	284a	212b	162c	16.8a	14.8b	13.3c
IS 26833	1288a	1295a	1184a	44b	52a	56a	416b	360b	269c	29.3a	25.0b	21.3c
IS 33261	2092a	1771a	1528a	50a	52a	53a	435a	374b	276c	42.0a	34.4a	28.6b
SSM 215	1114a	977b	932c	45b	45b	55a	229a	199a	148b	24.8a	21.6b	17.0c
MEAN	1310	1166	1092	46	51	61	327	282	189	28.3	23.0	17.8
Analysis of variance:												
Sowing date (S)	***			***			***			***		
Genotype (G)	***			***			***			***		
S x G	***			***			***			***		

¹Mean values for a given genotype and a given trait followed by the same letter are not statistically different (LSD test at $P < 0.05$).

Table 3-3. Influence of sowing date (June, July and August) on stem characteristics in the 14 sweet sorghum genotypes cultivated in Bamako, Mali and results of the two-way ANOVAs testing effects of genotype (G) and sowing date (S) on measured traits. Probabilities: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, NS = not significant ($P > 0.05$). Means with the same letter are not statistically different (LSD test) between sowing dates for a given variety and a phenological or morphological trait.

Accession number	Stem dry weight at maturity (g)			Number of visible internodes (without the peduncle)			Internode average length (cm)			Stem median diameter (mm)			Brix at anthesis (°B)		
	June	July	August	June	July	August	June	July	August	June	July	August	June	July	August
IS 2814	103a	62b	26c	14a	11b	6c	8a	9a	9a	17a	16a	11b	12.1a	11.3a	-
IS 2848	53a	28b	15b	10a	7b	6b	11a	11a	10a	16a	12b	9b	7.9b	10.8a	-
IS 5867	150a	134a	58b	16a	12b	8c	19ab	21a	18b	15a	14a	13a	14.4a	12.8b	-
IS 6351	263a	122b	40c	19a	15b	10c	16a	15b	11c	17a	13b	12b	15.0a	11.1b	12.0b
IS 8685	295a	210b	89c	22a	17b	10c	14a	15a	15a	17a	17a	16a	13.4a	10.1b	-
IS 10234	137a	82b	32c	16a	12b	7c	12a	12a	10a	17a	16a	13b	14.7a	14.3a	-
IS 15443	343a	193b	55c	18a	14b	7c	18a	19a	16b	20a	17a	13b	12.8a	11.7a	-
IS 20351	199a	122b	25c	16a	12b	6c	18a	20a	18a	16a	13b	10b	11.4a	10.9a	-
IS 23142	358a	262a	83b	26a	20b	14c	14a	15a	12b	22a	21a	17b	12.3a	9.0b	11.8a
IS 23254	253a	195b	47c	21a	16b	10c	16b	17a	15b	15a	15a	11b	13.0a	8.6b	12.6a
IS 26731	53a	36ab	20b	8a	6ab	6b	19a	20a	15b	14a	8b	9b	8.3a	9.6a	-
IS 26833	308a	202b	100c	20a	16b	13c	18a	18a	16a	18a	16b	15b	13.1a	11.5b	-
IS 33261	495a	557a	179b	30a	22a	17b	13b	15a	13b	25a	23a	20a	13.9a	14.5a	15.5a
SSM 215	190a	141b	44c	15a	12b	7c	12a	12a	12a	19a	17a	12b	12.4b	16.3a	-
MEAN	229	168	58	18	14	9	15	16	14	18	16	13	12.5	11.6	13.0
Analysis of variance:															
Sowing date (S)	***			***			***			***			***		
Genotype (G)	***			***			***			***			***		
S x G	***			***			***			*			***		

¹ Mean values for a given genotype and a given trait followed by the same letter are not statistically different (LSD test at $P < 0.05$).

Table 3-4. Correlation coefficients between sorghum traits measured at 50% anthesis in June (A) and July (B) sowings in the 14 genotypes cultivated in Sotuba, Mali in 2010. Correlations were not performed for August sowing due to the lack of sugar and dry weight measurements.

A. Sowing of June.

	Thermal time to flag leaf (°Cd)	Sugar concentration (mg.g ⁻¹ DM)	Sugar content (g.plant ⁻¹)	Stem dry weight (g)	Stem moisture (%)	Green leaf dry weight at anthesis (g)	Total leaf number	Phyllochron
Sugar concentration (mg.g ⁻¹ DM)	-0.1325							
Sugar content (g)	0.9160***	-0.0604						
Stem dry weight (g)	0.8987***	-0.3237	0.9545***					
Stem moisture (%)	-0.3259	0.8954***	-0.3153	-0.5154				
Green leaf dry weight (g)	0.4362	-0.6835**	0.4827	0.6299*	-0.7280**			
Total leaf number	0.9560***	-0.2521	0.9355***	0.9448***	-0.4141	0.5699*		
Phyllochron	0.6713**	0.1785	-0.4886	0.4209	-0.0453	-0.0436	0.4286	
Brix	0.5269	-0.3995	0.5864*	0.6015*	-0.7579**	0.5234	0.5394*	0.3574

Probabilities: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

B. Sowing of July.

	Thermal time to flag leaf (°Cd)	Sugar concentration (mg.g ⁻¹ DM)	Sugar content (g.plant ⁻¹)	Stem dry weight (g)	Stem moisture (%)	Green leaf dry weight at anthesis (g)	Total leaf number	Phyllochron
Sugar concentration (mg.g ⁻¹ DM)	-0.3861							
Sugar content (g)	0.8795***	-0.2727						
Stem dry weight (g)	0.8901***	-0.5521*	0.9440***					
Stem moisture (%)	-0.2431	0.6130*	-0.3855	-0.5271				
Green leaf dry weight (g)	0.7456**	-0.4939	0.8417***	0.8830***	-0.5667*			
Total leaf number	0.9023***	-0.4173	0.9141***	0.9361***	-0.5006	0.8550***		
Phyllochron	0.4741	-0.0585	0.1759	0.1615	0.4272	-0.0268	0.0506	
Brix	-0.0870	0.4177	0.2101	0.0355	-0.4509	0.1411	0.1603	-0.5159

Probabilities: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

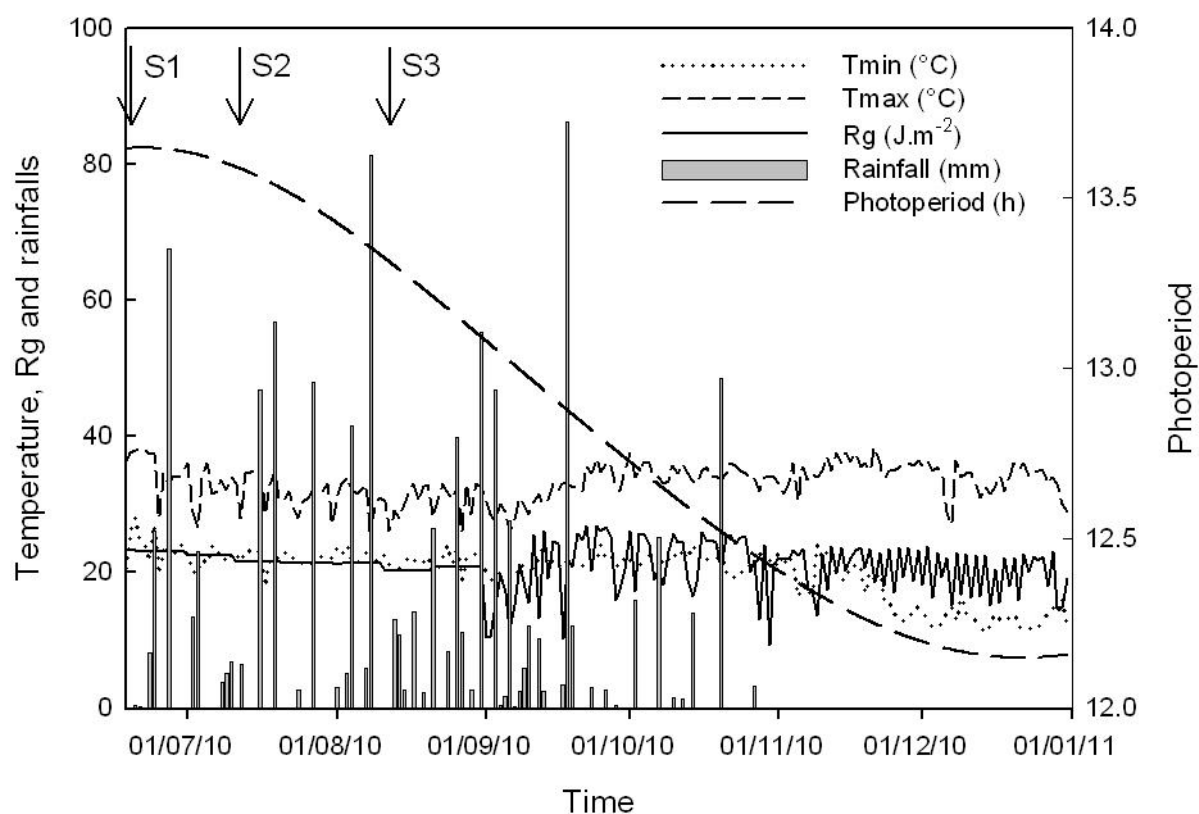


Figure 3-1. Daily climatic conditions at the Sotuba agronomical station of IER, Mali between the 18 June and the 31 December 2010. On left hand ordinate, Tmin and Tmax: minimal and maximal air temperature, respectively (°C); Rg: global radiation (MJ.m⁻²); rainfall (mm). On right hand ordinate, photoperiod (h). Black arrows indicate successive sowing dates (S1: 18/6; S2: 12/7; S3: 12/8).

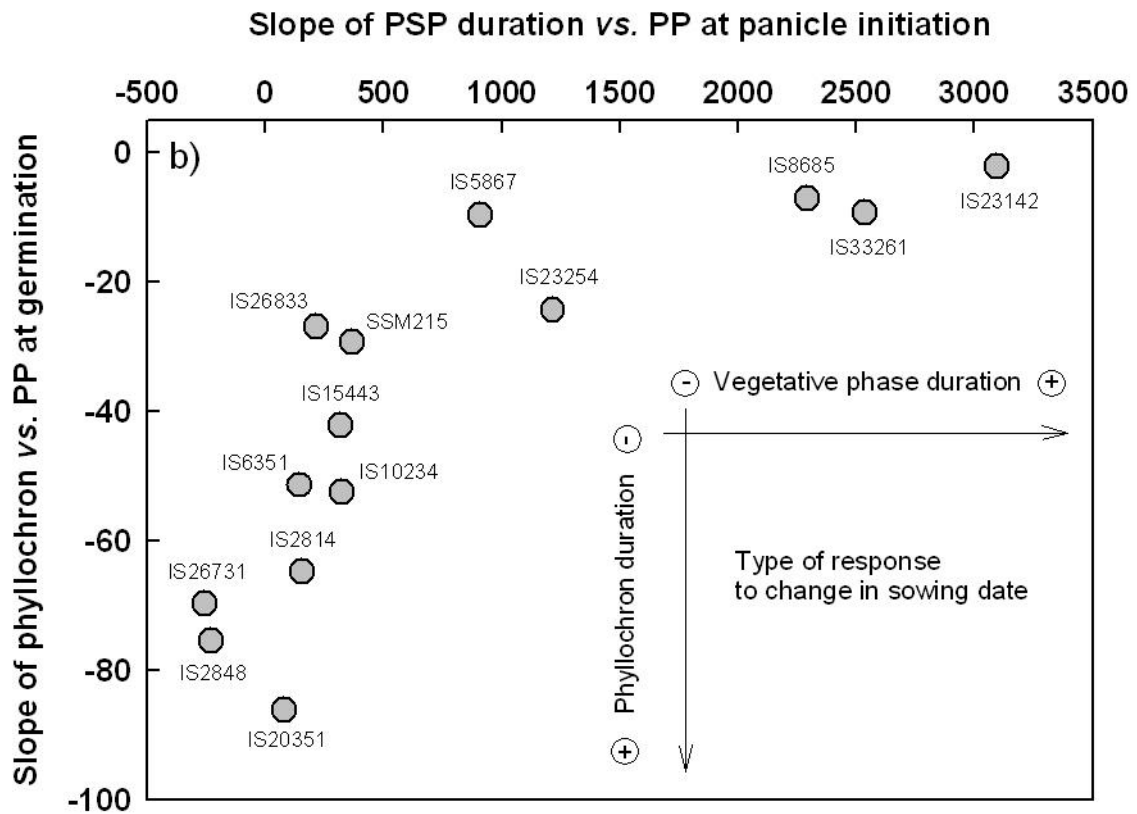


Figure 3-2. Relationship between the sensitivity of abscissa: PhotoSensitive Phase (PSP) duration to photoperiod (PP) at panicle initiation (PSP duration / PP at panicle initiation) and ordinate: phyllochron to PP at germination. Slopes are computed for each genotype using average data at the three sowing dates.

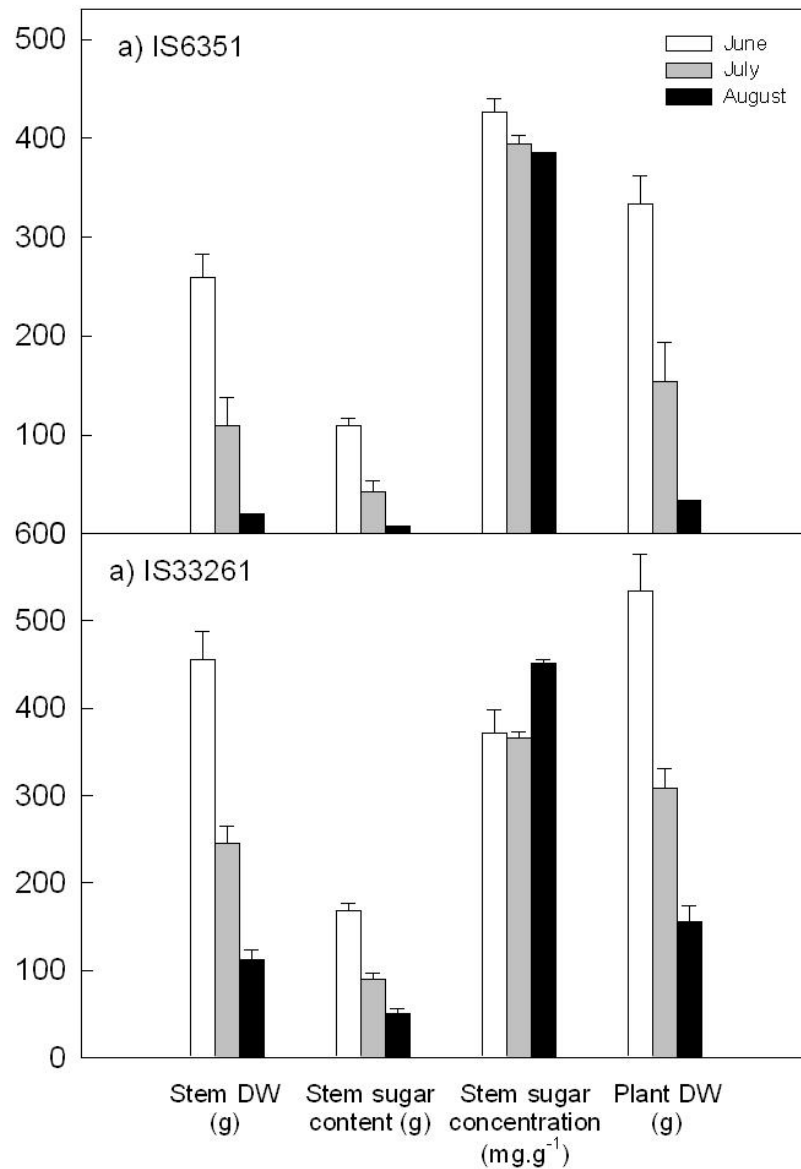


Figure 3-3. Stem DW, stem sugar production, stem sugar concentration and plant DW at anthesis in IS3361, a photoperiod-sensitive genotype and IS6351, a less photoperiod-sensitive genotype, cultivated in Sotuba, Mali in 2010 when sown in June (white bars), July (grey bars) and August (black bars). Data are means of four plants \pm SE.

Chapitre 4

Grain, sugar and biomass accumulation in photoperiod-sensitive sorghums. II. Physiological trade-offs during grain filling

4.1. Abstract

Sweet sorghum may be improved for developing multi-purpose crops producing bioethanol from sweet juice, food or feed from grains and feed from biomass (FFF). Photoperiod-sensitive and late maturing genotypes are particularly promising. In a first companion paper, the phenological and morphological plasticity of contrasting genotypes during pre-floral stages was investigated in the field in Mali for 3 sowing dates. The present study aims at characterizing sugar and grain yield trade-offs and sink-source relationships during post-floral development.

Fourteen sweet-stemmed genotypes were cultivated near Bamako, Mali at three sowing dates (June, July, August) under rainfed field conditions. Genotypes contrasted for sweetness, height, organ size, earliness and photoperiod sensitivity. Dry matter of different organs and stem sugar content were measured at anthesis and maturity. A panicle pruning treatment was implemented after anthesis.

No increase in sugar concentration was observed between anthesis and maturity except for two genotypes sown in July, indicating that sugar accumulation happened mainly before anthesis thus escaping from competition with grain filling. Change in sugar concentration from anthesis to maturity was negatively correlated with harvest index but not with grain yield. Panicle pruning enhanced stem sugar concentration only in few genotypes, indicating little competition between sugar and grain yield. Stay-green behavior favored sugar accumulation but not grain yield. Sugar accumulation had strong GxE interactions that were largely driven by biomass variation which in turn resulted from phenological plasticity.

Physiological trade-offs between sugar, biomass and grain yield under favorable rainfall are small or absent in late-maturing and photoperiod-sensitive sweet sorghums, due to (1) sugar accumulation prior to flowering and (2) limited panicle sink size for genotypes yielding up to about 3 tons grain per hectare. The results differ markedly from earlier reports because most previous studies focused on early maturing, photoperiod-insensitive germplasm.

4.2. Introduction

The large genetic and phenotypic diversity of sorghum and its adaptation to harsh climatic and cropping conditions (Nasidi *et al.*, 2010) open the possibility to develop food-feed-fuel (FFF) plants for a multitude of environmental conditions and particularly, semi-arid environments as in West Africa. Inbred varieties or hybrids have been developed for grain production in many environments. More recently, plants were developed especially for stem biomass and sweet juice production to support bio-fuel industries. But although sweet sorghums can produce grain while storing soluble

sugars in the stem (Murray *et al.*, 2008; Makanda, 2009), varieties combining high grain and sugar yields have not yet been systematically bred for, nor is the biological potential for such crops known. High-yielding FFF sorghums might become a promising source of income, in particular for African farmers, by providing grains for food or feed and sweet juice for sugar and ethanol production.

In sorghum, the dynamics and physiological control of sugar accumulation in stems are still poorly understood. Sorghum productivity is highly prone to Genotype x Environment (G x E) interactions (Chapman *et al.*, 2000; Haussmann *et al.*, 2000) and stem sweetness, as measured by refractometry of press sap (Brix), has only moderate heritability (Murray *et al.*, 2009). Traditional sweet sorghum landraces frequently have a small panicle, thus stem sweetness is commonly considered as a result of low panicle sink strength (Goldsworthy, 1970; Ferraris, 1981; Lingle, 1987). But interactions and trade-offs between panicle sink size, grain filling and stem development are complex, particularly in photoperiod sensitive sorghums that have great phenotypic plasticity (Goldsworthy, 1970; Goldsworthy and Tayler, 1970; Clerget, 2008). Competition for carbohydrates between grain filling and sugar storage in stems was suggested by Ferraris (1981), Fortmeier and Schubert (1995) and Rajendran *et al.* (2000) but artificial reduction of panicle sink capacity does not systematically result in increased sugar concentration in the stems (Broadhead, 1973; Fortmeier and Schubert, 1995). Moreover, the remobilization of stem reserves towards grains was frequently reported as being small (Fisher and Wilson, 1971; Ferraris and Charles-Edwards, 1986; Kiniry *et al.*, 1992). Varieties combining high grain yield and stem sweetness were recently reported (Almodares and Hadi, 2009; Blümmel *et al.*, 2009; Makanda *et al.*, 2009; Srinivasa *et al.*, 2009) and such plant types are sometimes cultivated by farmers in Mali (Gutjahr, 2011, pers. obs.).

In the preceding companion paper, Gutjahr *et al.* (submitted) demonstrated, based on a field experiment in Mali on fourteen sorghum genotypes planted on three dates that the accumulation of sucrose in sweet sorghum stems happens earlier than reported by many authors. This was in part explained by the effect of photoperiod on vegetative phase duration and the resulting delay of panicle initiation and flowering as compared to the onset of stem elongation. Sowing date had a strong effect on leaf number, plant biomass and sugar accumulation in stems at anthesis, largely driven by variable duration to flowering and variable phyllochron.

The present study aims at exploring G x E interactions and physiological trade-offs for sugar dynamics in the stem and grain filling during post-floral development, based on the same experiment as the companion paper. For 14 contrasting genotypes sown at three different dates, source-sink relations and competition for assimilates are evaluated on the basis of compartment dynamics and effects of pruning of the panicle sinks. Results are discussed with regards to strategies for improving and using PP-sensitive sorghums for FFF multi-purpose cropping. A third companion paper will use an

independent experimental design under controlled conditions for an in-depth physiological study on sugar storage in fertile and male-sterile, photoperiod-sensitive sweet sorghums.

4.3. Materials and methods

The experiment was described into detail in the first companion paper (Gutjahr *et al.* submitted), also here are just reminded the key points.

4.3.1. Plant material, study site and experimental design

Fourteen contrasted sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] accessions were chosen among the 210 accessions of the CIRAD sorghum core collection managed at Montpellier as described in the companion paper (Gutjahr *et al.* submitted). The experiment was conducted at Sotuba, on the agronomical research station of IER (Institut d'Economie Rural) near Bamako, Mali (12°39'N; 7°56'W). Climate conditions and experimental details are provided in the companion paper. Genotypes were tested in a randomized block design with three replications. Four plants in each elemental plot were randomly selected for a panicle pruning treatment by removing their inflorescence at the tip of the peduncle. The trial was repeated with three sowing dates: 18 June, 12 July and 12 August 2010.

4.3.2. Sampling and plant growth measurement

In each plot, the four plants chosen at thinning time for phenological observations and the four deheaded plants were sampled at physiological maturity for measuring the biomass components and brix values. Fresh weight (FW) and dry weight (DW) of green leaves (blade), stems (and sheaths), panicles and grains were determined on the basis of the four plants. Dry weight was estimated by the way of a first drying at sun and then in an oven at 70°C for 48h. 1000-Kernel DW was determined using an automatic seed counter (Numigral 1, Chopin Technologies, France).

4.3.3. Sugar quantification

Brix measurements and sugar content analysis were performed on the juice of four stems per replicate after crushing as detailed in Gutjahr *et al.* (2010). The total quantity of juice extracted from the stems was also measured. An equation was established accordingly to translate Brix measurements into soluble sugar concentration in mg per g of stem DW as described in Gutjahr *et al.* (submitted).

A percentage of variation between anthesis and maturity of stem sugar concentration and green leaf DW was calculated as follows: $(\text{value at maturity} - \text{value at anthesis}) \times 100 / (\text{value at anthesis})$. A negative percentage thus indicated a decrease between anthesis and maturity.

4.3.4. Data analysis

All statistical analyses were performed using SAS 9.2 (SAS Institute, Cary, NC, USA). Two-way ANOVAs with genotype (G) and sowing date (S), followed by a posteriori multiple comparisons of means using Fisher's LSD tests, were performed on the variables grain DW, kernel DW and stem sugar content at maturity. A three-way ANOVA with genotype, sowing date and panicle treatment (with or without panicle) was performed to compare stem sugar concentration at maturity. Because of the small number of experimental units, the assumptions of homogeneity of variance and normality were not met. The proc RANK was then used. T-tests were performed to compare sugar concentration at anthesis and maturity and sugar concentration at maturity in control and panicle-pruned plants. Matrices of correlation were performed with SAS PROC CORR. A critical value of $\alpha=0.05$ was used for the tests of significance.

4.4. Results

4.4.1. Grain yield and stem structural dry weight

Mean grain yield across genotypes decreased significantly ($P<0.0001$) by 56% from June to August sowings (Table 4.1), most of the decrease occurring from July to August. There was a strong GxE interaction ($P<0.0001$), however, resulting in different patterns among genotypes. While most genotypes showed a dramatic reduction in grain yield from July to August sowings, some (IS 23142, IS33261) achieved their highest yields in August. 1000-kernel DW, which differed among genotypes ($P<0.0001$) but not among sowing dates, was not responsible for the variation in grain yield. Low grain yield in August was in some genotypes aggravated by bird damage (IS2814, IS2848, IS15443 and IS26731).

Stem structural dry weight at grain maturity, defined here as stem dry weight minus estimated stem sugar content, decreased on average by 25% from June to July and by 76% from June to August sowings.

4.4.2. Stem sugars at grain maturity

Mean Brix values in the juice of the stems pressed at maturity was not affected by sowing date but showed strong genotype ($P<0.0001$) and genotype x sowing date ($P<0.0001$) effects (Table 4.1).

A change was observed in only one variety from June to July, but Brix values in August in some cases increased (IS2814, IS10234, IS26731) or decreased (IS6351, IS23142, IS33261). Chemical analysis of soluble sugar composition of press juice from crushed stem material for a subset of genotypes indicated that sucrose was the dominant compound (71% in June and 70% in July on average) but the glucose fraction sometimes attained up to nearly 30% of soluble sugars (Figure 4.1). The greatest sucrose fraction was found in IS8685 (90%) and in IS5867 (87%) in June and July sowings, respectively. The smallest sucrose fraction and largest glucose fraction was found in IS23142 in both June and July sowings.

Mean stem sugar concentration at grain maturity, as estimated from Brix values and stem tissue moisture content (Figure 4.3), increased gradually but non-significantly from June to July to August sowings, whereas absolute stem sugar content decreased dramatically, along with plant dry weight (Figure 3.2; error bars indicate variance among means of genotypes). In fact, absolute sugar content decreased significantly ($P < 0.05$) in all except two genotypes (IS2848, IS26731) which generally had very little sugar and stem dry weight and short cycle as reported in the companion paper. Overall, there were highly significant genotype (G), sowing date (S) and G x S effects on absolute stem sugar content ($P < 0.0001$).

4.4.3. Change in stem sugar concentration between anthesis and grain maturity

Patterns of change in stem sugar concentration from anthesis to maturity were different between June and July sowings (Figure 4.3). A corresponding comparison was not possible for August sowing because data for anthesis was incomplete.

For June sowing (which on average gave the largest grain yields; Table 4.1), no change in stem sugar concentration was observed from anthesis to grain maturity except for three genotypes which exhibited a decrease ($P < 0.05$; IS 2848, IS 6351 and IS 10234) (Figure 4.3a). For July sowing, 7 out of 14 genotypes showed a decrease in sugar concentration ($P < 0.05$) and 2 showed an increase (IS 6351, IS 23142). On average, the change in sugar concentration from anthesis to maturity was -12% for June and -26% for July (the two plants that exhibited an increase in concentration excluded).

The variation in stem sugar concentration during grain filling (% change from anthesis to grain maturity) was significantly ($P < 0.01$) negatively correlated with harvest index, i.e. the proportion of grain relative to plant aboveground DW (Figure 4.4). In this analysis, only genotypes were considered whose grain yield was not affected by bird damage, which was extensive in some cases.

4.4.4. Correlations among observed variables

Grain yield for June sowing was positively correlated ($P<0.05$) with green leaf DW at anthesis but this was not the case for July sowing (Table 4.2). In general, grain yield showed poor correlation with morphological or sugar related variables. Grain harvest index (HI), however, showed a significant negative correlation ($P<0.05$) with green leaf DW at maturity for both June and July sowings, and also with the change in green leaf dry weight from anthesis to maturity for June sowing ($P<0.01$). Consequently, a greater harvest index was associated with poor stay-green. In contrast to grain yield, stem dry weight at maturity was positively correlated with green leaf dry weight, both at anthesis and maturity for June and July sowings.

Highly significant positive correlations were observed for stem absolute sugar content (both at anthesis and maturity) vs. green leaf DW at maturity ($P<0.001$ or $P<0.0001$, depending on date). This relationship was not due to variation in sugar concentration, which varied little, but to variation in the stem DW containing the sugars. A significant negative correlation was observed between the change in sugar concentration between anthesis and maturity and HI in June, indicating that high HI was associated with disappearance of stored sugars in the stems. This correlation was not significant for July sowing, however.

Brix values (measured on press sap) generally showed no or weak correlations with sugar concentration (DW based) for the same organs. This was due to large variation in stem water content. The three sugar related variables Brix, DW-based concentration and absolute content per plant thus behaved very differently and were mostly not correlated among each other.

Fewer variables participated in the correlation matrix for August sowing because data was incomplete for the observations at anthesis (Table 4.2C). A strong positive correlation between grain yield and green leaf dry weight at maturity ($P<0.001$) was observed in August but not in the earlier sowings, probably due to the very small leaf number produced after sowing in August (refer to 1st sequel of this article; Gutjahr *et al.* submitted). In fact, the grain yield vs. green leaf dry weight correlation improved from $R=0.28$ (n.s.) in June over $R=0.47$ (n.s.) in July to $R=0.92$ ($P<0.001$) in August. The strong positive correlation of stem absolute sugar content vs. green leaf dry weight at maturity for June and July was also carried into the August sowing ($P<0.001$). Consequently, stay-green behavior generally favored stem sugar production at maturity but had a negative effect on harvest index. Grain yield benefitted from stay-green significantly for August sowing, which was associated with a general reduction in leaf production due to phenology (cf. companion paper).

4.4.5. *Effect of panicle pruning on stem sugar at maturity*

Pruning of the panicle prior to grain filling did not affect stem sugar concentration for June sowing but significantly ($P < 0.05$) increased it in 5 of 14 genotypes for July sowing and 2 of 14 genotypes for August sowing (Figure 4.5). The genotypes showing an increase in July and August were not the same. The cases of increased stem sugar concentration after panicle pruning do not necessarily indicate different levels of mobilization because dilution effects from stem structural growth after flowering may have contributed too (data not presented). Overall, stem sugar concentration at maturity was remarkably similar between pruned and panicle-bearing plants for all sowing dates while genotypic differences remained preserved. The presence of a panicle thus had little effect on stem sugar storage at maturity.

4.5. Discussion

The central question in this study was whether physiological trade-offs exist among grain, sugar and dry matter accumulation in West-African, mostly photoperiod-sensitive, sweet sorghums; which traits and sink-source interactions contribute to these yield components; and how sowing date (mainly affecting day length) affects them. The preceding companion study (Gutjahr *et al.*, submitted) analyzed phenological and morphological determinants of plant structure at anthesis. This study focused on processes taking place after anthesis.

4.5.1. *Brix is a poor indicator of stem sugar accumulation*

Concentration of soluble sugars in juice and measured indirectly by refractometry (Brix) are often used to estimate stem sugar concentrations (Broadhead, 1973; Rajendran *et al.*, 2000; Makanda *et al.* 2009). Broadhead (1973), however, reported that stem juiciness alone can explain variations in stem sugar concentration. The dilution effect of tissue moisture content on Brix values was not always taken into account (Makanda *et al.* 2009) which might explain some contradictory reports (Broadhead, 1973; Rajendran *et al.*, 2000). The increase in Brix values between anthesis and maturity reported by Makanda *et al.* (2009) probably resulted from a decrease in stem moisture, which was also observed in the present study (data not presented). The opposite trend was observed when brix data was converted into concentration (mg sugar per g of stem dry weight). In this study, the variation of stem moisture was taken into account.

4.5.2. Grain yield and the role of the panicle sink in stem sugar dynamics

Although the 14 genotypes studied here are adapted to the environment chosen for the experiment, grain yield was affected by pests and diseases and thus was more difficult to interpret than the other yield components, namely stem dry weight and sugar content. Spikelets and grains were mildly affected by sorghum midge *Stenodiplosis sorghicola* (Diptera: Cecidomyiidae) and molds, respectively. More severe, and quite specific to genotype and sowing date, was bird damage, especially the Senegal Parrot (*Poicephalus senegalus*) that escaped day-time bird control measures by attacking after sunset. Hence, grain yields underlined in Table 4.1 (IS6351 (July), IS8685, IS23142, IS23254) did not represent the biological potential.

Grain yield observed on undamaged plots generally decreased with late sowing, particularly in August (Figure 4.2; Table 4.1; except IS2848). This phenomenon is frequently observed and is consistent with the phenological and growth analysis presented in the companion paper (Gutjahr *et al.* submitted): earlier flowering due to short days or longer phyllochron, depending on genotype, reduced leaf number, internode number and biomass at flowering. Similar observations were reported for the same locality by Kouressy *et al.* (2008) who concluded that sorghum yield was sink-limited under these conditions. In this study, grain filling was probably sink limited for June sowing but became increasingly source limited towards August sowing, as indicated with the increasing positive correlation between grain yield and green leaf dry weight at maturity ($P < 0.001$ for August; Table 4.2A, B). This hypothesis is supported by the stability of 1000-kernel weight for June and July sowings (mean of 26g across genotypes) but only 22g for August, although this trend was not significant for any given genotype.

The high grain yields observed for some genotypes for August sowing indicate strong G x E for grain yield as commonly reported for sorghum (Chapman *et al.*, 2000; Haussmann *et al.*, 2000). Comparing this experimental design to trials used for an industrial production is not possible, since plants were sown at low density (50,000 plants per hectare). But eight and six genotypes yielded more than 50g of grain DW per plant respectively in June and July. When expressed per hectare, grain yields were superior to three tons per hectare in five and four genotypes in June and July. These results corroborate Goldsworthy (1970) and underline the potential combination of long growing seasons and high grain yields in sorghum.

It is difficult to judge to what extent the mobilization of sugars stored in stems (in terms of change from anthesis to maturity) is a valid indicator of source limitation of grain filling. On the one hand, we observed a negative correlation between change in stem sugar reserves and harvest index across genotypes and sowing dates (but not for grain yield *per se*), but on the other hand, ablation of

the panicle after anthesis did not change sugar reserves in the stem in most genotypes at maturity. In fact, genotypic patterns of sugar concentration at maturity were remarkably similar for ablated and panicle-bearing plants, both in terms of genotypic patterns and absolute levels. Genotypic patterns of stem sugar concentration at maturity were quite different among sowing dates (indicating strong G x E) but very similar between ablated and panicle-bearing plants. The G x E and E effects on sugar concentration were thus probably only in small part, or only for a few genotypes, mediated by sink-source relations involving the panicle.

We suggest that the bird damage affecting grain yield probably had little effect on the other plant variables studied here, such as sugar and biomass accumulation, and thus had little bearing on the overall results.

4.5.3. *Genotype and environment effects on stem sugar accumulation*

Sweet sorghum is a generic term for soluble-sugar accumulating sorghum genotypes, which can be found in most genetic groups of the species (Ritter *et al.*, 2007). Most sweet sorghums are tall, produce much biomass and are considered to have low grain yield and poor grain quality (Goldsworthy, 1970; Ferraris, 1981; Lingle, 1987). But, as pointed out by Murray *et al.* (2009), sweet sorghums have undergone little breeding and genetic study, and molecular, biochemical or physiological markers for their classification are largely unavailable. The genotypes investigated here are landraces and (except for IS23254) do not meet the usual sweet sorghums' criteria as defined by local farmers (taste of the juice, fiber content, juiciness), and thus often by agronomists during phenotyping. However, sugars could represent up to 49% of stem dry weight and sucrose accounted for more than 60% of total sugars in most varieties. Such values are reported in sugarcane (Lingle *et al.*, 2009; Grof *et al.*, 2010). The estimated stem sugar contents based on Brix and tissue moisture content varied greatly among genotypes and sowing dates, but were at least as high as those measured in sugarcane and in some sweet sorghum varieties of reference (Woods, 2001; Ali *et al.*, 2008) or those investigated by Makanda *et al.* (2009) and Teetor *et al.* (2011). IS33261 and IS23254 attained 300 and 560 mM sucrose, respectively for June sowing and IS6351 attained 460 mM sucrose for July sowing; IS23254 and IS33261 reached 115 mmol sucrose per kg of FW in June and July plants, respectively. Hence, our results were close to the 16.2-23.8°B, 400-500 mM sucrose and 80-190 mmol sucrose per kg of fresh weight reported by Grof *et al.* (2007), Lingle (1999) and Lingle and Tew (2008), respectively in sugarcane.

Sugar accumulation in stems in absolute terms was not correlated with tissue sugar concentration because variation in biomass (compartment size) was much greater than variation in concentration. The environmental and genotypic drivers of dry matter accumulation thus also drove

storage. As reported in the companion study (Gutjahr *et al.* submitted), phenology (day length dependent duration to flowering and phyllochron) and morphology (e.g. internode dimensions) largely explained plant biomass at flowering. This explains the strong G x E effects on sugar production in this study, which generated environment variation through sowing date.

High sugar yield of sweet sorghums is thought to require plants having tall and thick stems and low grain yields (Goldsworthy, 1970; Ferraris, 1981), resulting from small panicle sinks (Ferraris and Charles-Edwards, 1986; Lingle, 1987). In fact, small or thin-stemmed genotypes in this study such as IS2814, IS2848 or IS26731 had low sugar yield despite high stem sugar concentration at anthesis.

In the present study, sugar storage stagnated or decreased between anthesis and maturity in most genotypes. Removal of the panicle sink increased sugar accumulation in only a few genotypes. Plants accumulated most of the sugar reserves before the panicle became a sink, and this reserve was largely conserved after flowering regardless of the presence of a panicle. Stem sugar concentration or content at maturity were not correlated with grain yield or harvest index. Maintenance of green leaf dry weight at maturity (stay-green behavior) thereby contributed positively to sugar accumulation but not to grain yield, probably due to continuing growth of the internode compartment after flowering.

Panicle pruning or cytoplasmic male sterile (CMS) lines are commonly used in sweet sorghums to estimate trade-offs of reproduction vs. stem sugar reserves (Broadhead, 1973; Ferraris, 1981; Fortmeier and Schubert, 1995; Rajendran *et al.*, 2000). However, the results are controversial. Soluble solids and sucrose were reported to increase after panicles were removed by Broadhead (1973). Ferraris (1981) found that sucrose yield in pruned plants equaled the amount of sugars accumulated in the stem plus grains of intact plants, indicating a large trade-off. Sugar concentrations were found to increase in only one of the two genotypes studied by Fortmeier and Schubert (1995) and no increase in stem sugar concentration was reported by Rajendran *et al.* (2000).

The present study demonstrated the difficulty of determining the maximum sugar yield of plants with these techniques. Panicle pruning resulted in an increase in stem sugar concentration in none, five and only two genotypes in June, July and August, respectively (Figure 3). Overall, grain vs. sugar trade-offs were small and mostly absent. Whether or not a greater panicle sink, implemented on the same plant types, would increase the trade-off cannot be tested here and would require mechanistic modeling and/or genetic engineering.

4.5.4. *Contradicting reports on sweet sorghum are related to type of germplasm*

The dynamic relationships among stem sugar accumulation, plant growth and phenology have been interpreted in two ways. According to many breeders and to reports by Ferraris (1981) and McBee and Miller (1982), sugar accumulation is largely a post-anthesis phenomenon. Secondly, Lingle (1987) proposed that sugar accumulation may set on before anthesis, suggesting that sucrose concentration may be related to internode age and that sorghum and sugarcane may have a similar pattern of sucrose storage (Hoffmann-Thoma *et al.*, 1996). The present study supports the latter view: most of the final soluble carbohydrate reserves were established before anthesis. A recent, independent study (Zhao *et al.*, 2009) confirms this finding. The cause behind the conflicting reports appears to reside in the choice of germplasm. Short-duration, photoperiod-insensitive genotypes produce comparatively little sugar before anthesis (Makanda *et al.* 2009; Teetor *et al.* 2011), whereas late maturing and/or photoperiod-sensitive materials store accumulate large sugar quantities before anthesis.

Makanda *et al.* (2009) reported a negative correlation across genotypes between grain yield and stem DW at maturity and between grain yield and days to anthesis, and a positive correlation between grain yield and stem juice Brix values at anthesis and maturity. The sample of genotypes investigated here behaved markedly differently, probably because it was composed of different phenological plant types. The population studied by Makanda *et al.* (2009) was composed of materials bred for grain yield and earliness, and no emphasis on sweetness. Our study included traditional landraces and compared short and/or early with tall and/or late genotypes, all of which were sweet. This greater diversity in phenology and morphology brought out different partitioning patterns and strong GxE interactions generated by sowing date, This phenotypic plasticity cannot be understood without considering the phenology and organogenetic dynamics taking place prior to anthesis (cf. companion paper, Gutjahr *et al.* submitted).

4.5.5. *New questions and hypotheses*

Like in other cereals, sorghum stem was previously regarded as a passive sink for carbohydrates (Tarpley *et al.*, 1994; Rajendran *et al.*, 2000) that would be filled when the demand for C by other sinks in the plants is reduced (Broadhead, 1973; Fisher and Wilson, 1975; Muchow and Wilson, 1976) or when the panicle is naturally small (Goldsworthy, 1970; Lingle, 1987). Conversely, a reallocation of reserves would occur to sustain grain filling depending on the post-flowering carbohydrate status of the plant (Fisher and Wilson, 1975; Blum *et al.*, 1997). This view conflicts with our observation of stem tissue sugar concentration being relatively stable despite the large phenotypic plasticity in morphology, organ number and biomass generated by sowing date. A sweet

sorghum genotype appears to be sweet in a large variety of environments and in our study, the strong G x E interaction affected total storage (which was a function of physical compartment size) more than concentration. This raises the question whether sugar storage in sorghum stems constitutes an active sink that may compete with others, or a spill-over reservoir. Conversely, are panicles of sweet sorghums small because internode growth and sugar storage compete with the developing panicle? These questions will be addressed in the next companion paper of this series of three based on a greenhouse experiment. Our results in the present study suggested that some genotypes combine both sugar and grain yields high enough to be used in a multi-purpose approach, such as SSM215, IS6351, IS26833 and IS15443 and to a lesser extent IS5867, IS10234, IS20351 and IS33261. The possibility to combine both traits was reported by Murray *et al.* (2008) in a QTL study. The variation in sugar concentration between anthesis and maturity mainly in July sowing and its negative relationship with harvest index (Figure 4.4) suggest that certain genotypes were not able to feed developing grains solely with post-anthesis C assimilation. However, no significant changes in sugar content per plant were observed either in June or July sowings between anthesis and maturity (data not shown), confirming that post-anthesis sugar remobilization to grain is marginal under non-limiting growing conditions (Fisher and Wilson, 1971; Ferraris and Charles-Edwards, 1986; Blum *et al.*, 1997).

The larger question on sorghum sugar accumulation is its adaptive value and eco-physiological function, given the fact that most sorghums are not sweet but are adapted to the same habitats. If the large sugar reserves are not needed in many genotypes to augment resources for grain filling under favorable hydrological conditions, as reported here, they might become important under more stressful conditions. Further studies should thus address broader ranges of environments.

Table 4-1. Influence of planting date on mean values of grain dry weight per plant, 1000-kernel dry weight and stem structural DW (total stem DW minus sugar content) and stem sugar content at maturity in the 14 sweet sorghum genotypes cultivated in Bamako, Mali and results of the two-way ANOVAs testing effects of genotype (G) and sowing date (S) on measured traits. Probabilities: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, NS = not significant ($P > 0.05$). Means with the same letter are not statistically different (LSD test) between sowing dates for a given variety and a given trait. Underlined grain yields were affected by bird damage and were not used for the analysis in Figure 3.

Accession number	Grain DW per plant (g)			1000-Kernel DW (g)			Stem sugar content at maturity (g)			Stem structural DW at maturity (g)			Brix at maturity (°B)		
	June	July	August	June	July	August	June	July	August	June	July	August	June	July	August
IS 2814	80a	67a	<u>2b</u>	26a	26a	22a	32a	14b	12b	73a	48b	13c	13.3ab	8.7b	16.0a
IS 2848	64a	33b	<u>8c</u>	28a	23a	23a	9a	5a	6a	44a	23b	9c	6.1a	6.9a	12.9a
IS 5867	32ab	39a	14b	29a	29a	32a	50a	43a	23b	101a	90a	35b	14.0a	12.1a	15.6a
IS 6351	55a	<u>6c</u>	32b	23a	26a	19a	90a	59b	14c	173a	63b	26c	14.5b	19.4a	12.2b
IS 8685	<u>9a</u>	<u>2a</u>	<u>2a</u>	27a	16a	16a	85a	67a	31b	211a	142b	58c	21.3a	19.2a	20.9a
IS 10234	60a	68a	19b	30a	31a	30a	36a	24a	13b	102a	58b	19c	14.2b	15.7b	18.8a
IS 15443	111a	95a	<u>1b</u>	33a	33a	23a	82a	53b	18c	261a	140b	37c	19.0a	18.8a	22.6a
IS 20351	42a	54a	11b	23a	25a	21a	54a	32b	7c	146a	90b	18c	16.7a	15.5a	16.7a
IS 23142	<u>9b</u>	<u>8b</u>	39a	13a	16a	14a	137a	131a	26b	220a	158b	58c	14.3a	14.6a	7.9b
IS 23254	<u>8a</u>	<u>5a</u>	<u>8a</u>	17a	16a	16a	96a	75a	21b	158a	120b	26c	16.4a	14.4a	14.3a
IS 26731	23a	22a	<u>7a</u>	20a	18a	12a	21a	15a	13a	32a	21ab	7b	10.0b	9.8b	18.6a
IS 26833	74a	50ab	47b	28a	28a	18a	78a	52b	29c	229a	151b	71c	17.1a	15.7a	16.9a
IS 33261	53b	47b	94a	42a	41a	35a	175a	84b	50c	320a	473a	129b	15.8ab	16.9a	13.5b
SSM 215	75a	66a	21b	30a	30a	30a	57a	61a	22c	133a	79b	21c	17.7a	20.1a	18.7a
Mean	50	40	22	26	26	22	72	51	20	157	118	38	15.0	14.8	16.1

ANOVA:

Sowing date (S)	***	NS	***	***	NS
Genotype (G)	***	***	***	***	***
S x G	***	NS	***	***	***

¹Mean values for a given genotype and a given trait followed by the same letter are not statistically different (LSD test at $P < 0.05$).

Table 4-2. Correlation coefficients between traits measured at grain maturity in the 14 genotypes in Sotuba, Mali in 2010 in June (A), July (B) and August (C) sowings. DW = dry weight. . SCP = sugar concentration per plant. SPP = sugar production per plant The percentages of variation in sugar concentration and green leaf dry weights were calculated between anthesis and maturity. A negative percentage indicates a decrease of the values of the trait between anthesis and maturity. Probabilities: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

A. Sowing of June	Grain yield (maturity)	Stem DW at maturity	Green leaf DW at anthesis	Green leaf DW at maturity	SCP at anthesis	SCP at maturity	SPP at anthesis	SPP at maturity	% variation SCP	% variation green leaf DW	Harvest index	Leaf/grain ratio
Stem DW at maturity(g)	0.3160											
Green leaf DW at anthesis (g)	0.7072*	0.7324*										
Green leaf DW at maturity (g)	0.2776	0.9637***	0.6472*									
SCP at anthesis (mg.g ⁻¹ DW)	-0.5511	-0.3947	-0.6851*	-0.3934								
SCP at maturity (mg.g ⁻¹ DW)	-0.5875	0.1229	-0.1264	0.0960	0.4300							
SPP at anthesis (g)	0.0720	0.9127***	0.5569	0.8791***	-0.1123	0.3273						
SPP at maturity (g)	0.1296	0.9633***	0.6290*	0.9180***	-0.2041	0.3073	0.9742***					
% of variation in SCP	-0.0048	0.4868	0.5460	0.4520	-0.6160*	0.4378	0.3756	0.4597				
% of variation in green leaf DW	0.0596	0.8364**	0.4492	0.9351***	-0.3345	0.1806	0.8253**	0.8176**	0.4549			
Harvest index (g.g ⁻¹)	0.2418	-0.7093*	-0.3761	-0.7300*	0.2850	-0.5245	-0.7147*	-0.7293*	-0.7354**	-0.8117**		
Green leaf DW:grain DW ratio	-0.3861	0.5532	0.3619	0.5009	-0.2469	-0.5377	0.6093*	0.6444*	0.7486**	0.5306	-0.8284**	
Brix (°B)	0.4282	0.6714*			-		0.4720	0.5526	0.7762**	0.6042*	-0.6898*	0.5385

Table 4-2. Continued

B. Sowing of July	Grain yield (maturity)	Stem DW at maturity	Green leaf DW at anthesis	Green leaf DW at maturity	SCP at anthesis	SCP at maturity	SPP at anthesis	SPP at maturity	% variation SCP	% variation green leaf DW	Harvest index	Leaf/grain ratio
Stem DW at maturity(g)	0.1097											
Green leaf DW at anthesis (g)	0.5761	0.7694**										
Green leaf DW at maturity (g)	0.4658	0.7355*	0.9040***									
SCP at anthesis (mg.g ⁻¹ DW)	-0.2679	-0.3593	-0.4083	-0.2329								
SCP at maturity (mg.g ⁻¹ DW)	0.0201	-0.4037	-0.0932	-0.0358	0.5838							
SPP at anthesis (g)	0.1594	0.9325***	0.8571**	0.8556**	-0.2130	-0.1391						
SPP at maturity (g)	0.3034	0.8657**	0.9084***	0.8768***	-0.2642	0.0073	0.9669***					
% of variation in sugar SCP	0.3742	-0.2176	0.2310	0.1404	-0.1814	0.6779*	-0.0403	0.1924				
% of variation in green leaf DW	0.5190	0.4889	0.6703*	0.8789***	-0.0458	-0.0200	0.6236	0.6350*	0.0480			
Harvest index (g.g ⁻¹)	0.0291	-0.8108**	-0.7231*	-0.6847*	0.2561	-0.0297	-0.8998***	-0.8965*	-0.1950	-0.4321		
Green leaf DW:grain DW ratio	-0.1283	0.8670**	0.7269*	0.6899*	-0.2384	-0.1441	0.9198***	0.8506*	-0.0617	-0.3815	-0.9284***	
Brix (°B)	0.6111	0.5078	0.7960**	0.8604**	-0.1548	0.3016	0.6687*	0.7971**	0.5199	0.8133**	-0.6003	0.4490

C. Sowing of August	Grain yield (maturity)	Stem DW at maturity	Green leaf DW at maturity	Sugar SCP at maturity	Sugar SPP at maturity	Harvest index
Stem DW at maturity(g)	0.9563***					
Green leaf DW at maturity (g)	0.9218**	0.9330***				
SCP at maturity (mg.g ⁻¹ DW)	-0.5263	-0.5243	-0.3322			
SPP at maturity (g)	0.9059**	0.9707***	0.9323***	-0.3143		
Harvest index (g.g ⁻¹)	0.2939	0.0264	0.0450	-0.1813	-0.0753	
Brix (°B)	-0.3652	-0.3347	-0.1171	0.4572	-0.2823	-0.0595

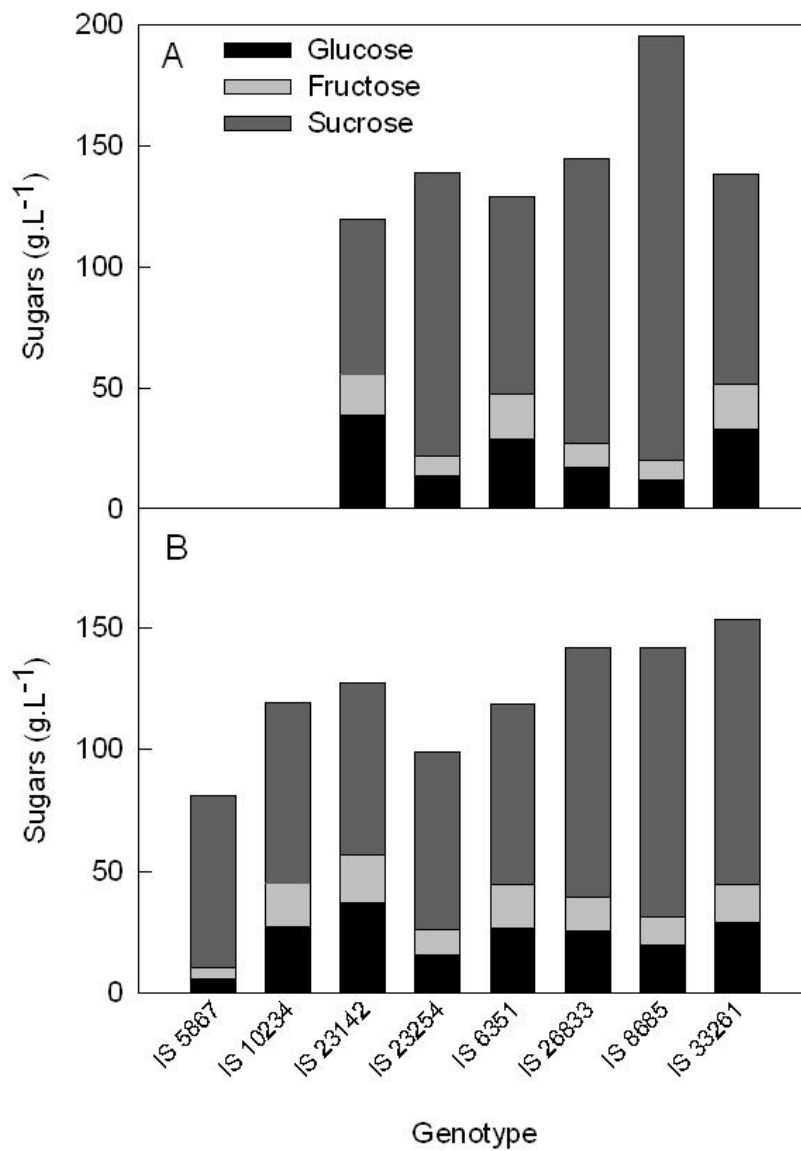


Figure 4-1. Sugar composition (glucose, fructose and sucrose) quantified by high performance ionic chromatography with pulsed amperometric detection (HPLC) in juice after stem crushing at grain maturity in six genotypes sown in June (A) and eight genotypes sown in July (B) at Sotuba, Mali in 2010. Data are means of four plants. Plants for the sowing of August were not available.

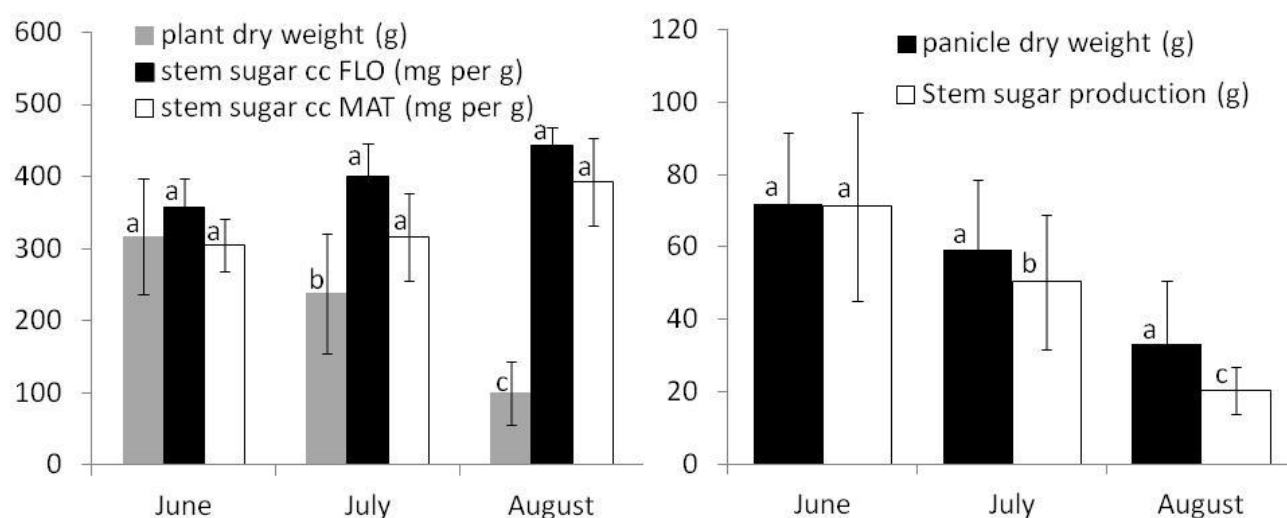


Figure 4-2. Average value and standard deviation for means of the 14 genotypes studied and for each sowing date (June, July, August) in Sotuba (Mali, 2010) for (left) plant dry weight at maturity, stem sugar concentration (cc) at flowering (FLO) and maturity (MAT) (in mg per g of stem dry weight) and (right) panicle dry weight and plant sugar production at grain maturity. Columns of the same variable carrying the same letter (a, b, c) are not significantly different according to LSD test.

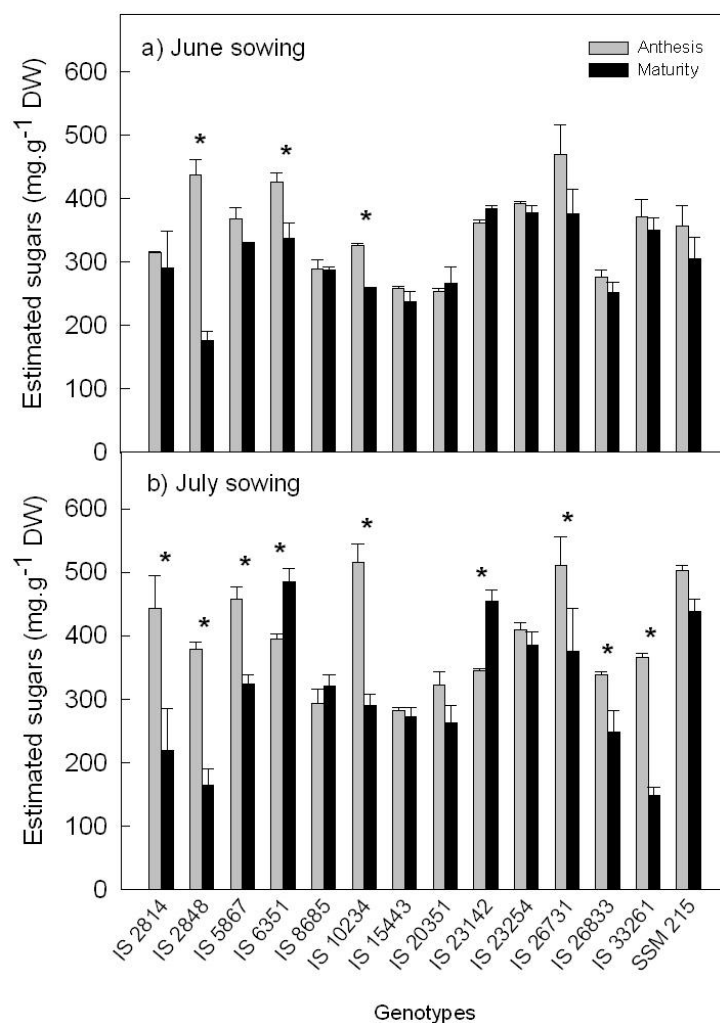


Figure 4-3. Estimated sugar concentration at anthesis (grey bars) and grain maturity (black bars) in the stem of the 14 genotypes cultivated in Sotuba, Mali in 2010 when plants were sown in (a) June, (b) July and (c) August. Data are means of four plants \pm SE. * indicates that mean values at maturity are significantly different ($p < 0.05$) from those at anthesis.

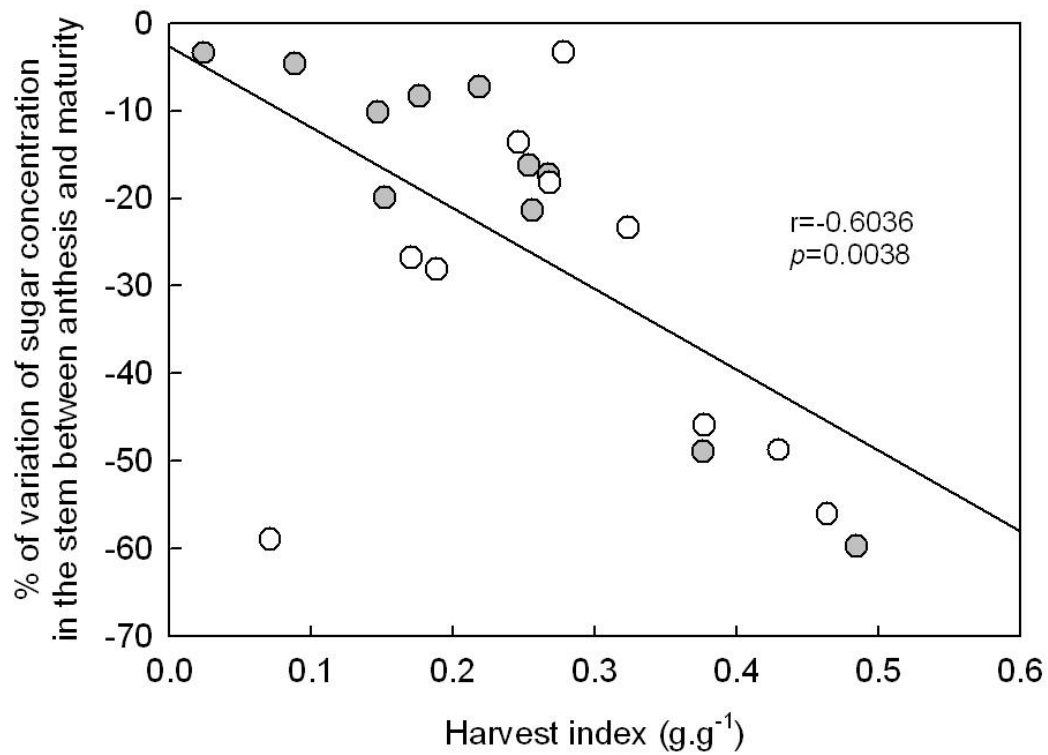


Figure 4-4. Relationship between the variation in sugar concentration between anthesis and maturity in the stem (difference in % of sugar concentration at anthesis) and the grain:plant dry weight (DW) ratio (harvest index) in June (closed) and July (open symbols) sowings. Genotypes whose panicle was attacked are not presented. The regression line when both sowing dates are combined is shown on the same figure.

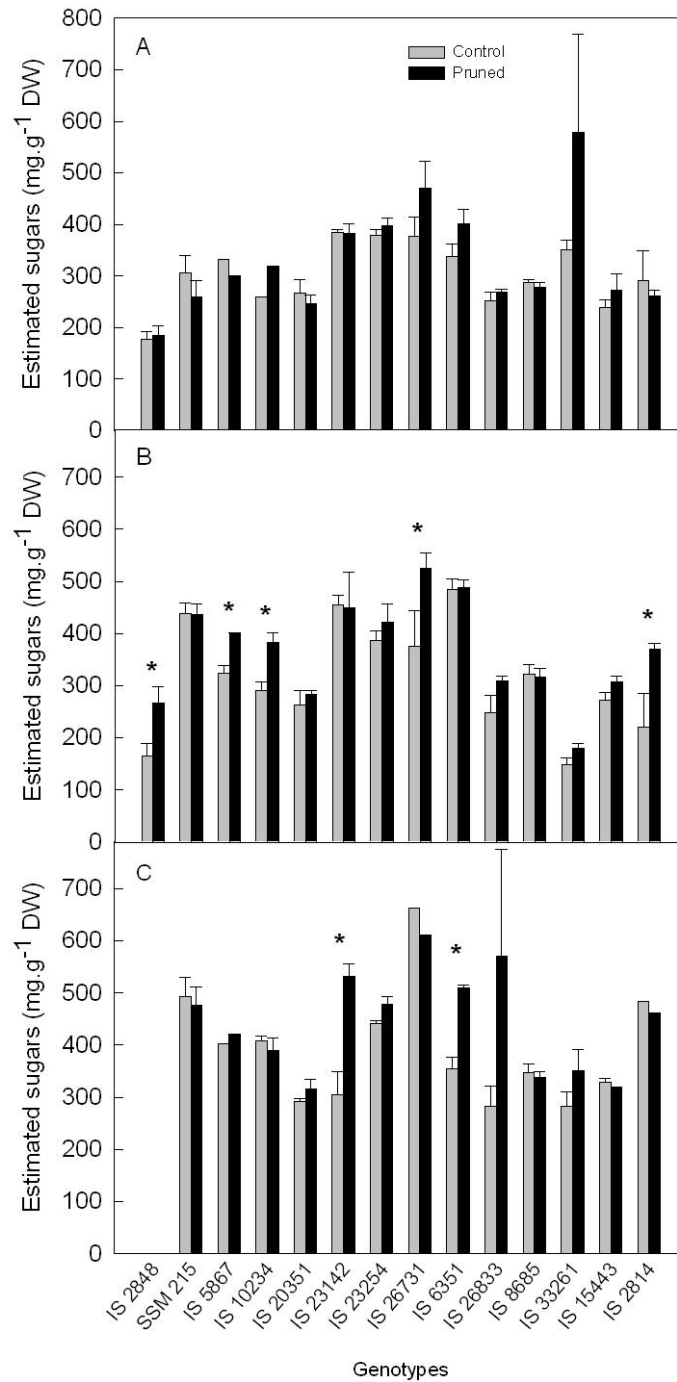


Figure 4-5. Sugar concentration estimated at grain maturity in the stem of intact (control) and panicle-pruned plants of the 14 sorghum genotypes cultivated in Sotuba, Mali in 2010 and sown in June (a), July (b) and August (c). Data are means of four plants \pm SE. * indicates that mean values are significantly different ($p < 0.05$).

Grain, sugar and biomass accumulation in photoperiod-sensitive sorghums. III. Kinetics of sugar accumulation in stems, related biochemical pathways and interaction with phenology

5.1. Abstract

Sweet sorghums [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] accumulate soluble sugars, predominantly sucrose, in stems similar to sugarcane. Sorghum sweetness is a complex trait with moderate heritability and marked genotype by environment interaction (GxE). This study investigated the sucrose accumulation in a sterile (no grain filling) and fertile near-isogenic line of the photoperiod (PP) sensitive cultivar IS2848 in two greenhouse experiments under non-limiting water and nutrient resources. Variable phenology was induced by applying a short (12h, Exp. 1) and a long (13h, Exp. 2) PP. Dynamics of plant growth and phenology, sugar accumulation and enzyme activities related to sugar metabolism (sucrose synthase, sucrose-phosphate synthase, soluble acid invertase) in internodes were investigated.

Plants cultivated under 13h-PP flowered 28 days later and attained 3-fold higher sucrose concentration at anthesis as compared to those grown under 12h-PP. Sucrose accumulation pattern in individual internodes was driven by physiological age of the individual internodes and not by plant phenology *per se*. Competition with grain filling was greater under 12h-PP as most sucrose accumulation in internodes occurred after flowering under this condition. Sucrose accumulation in the stem of sterile plants benefited only marginally from the absence of competition with grain filling. Enzyme activities showed marked developmental patterns but contributed little to explaining differences between treatments and genotypes.

The study demonstrates that physiology of sucrose storage in sweet sorghum resembles that of sugarcane but is more complex due to PP effects on phenology and competition with grain filling. Field results on 14 genotypes contrasting in terms of phenology and photoperiod sensitivity presented in two previous companion papers are confirmed. Perspectives for developing sorghum ideotype concepts for food-fuel (FF) crops are discussed.

5.2. Introduction

Sugar-accumulating crops are widely used as a potential source of biofuel. The physiology and genetics of sugar accumulation is particularly well studied in sugarcane because of this crop's economic importance for sugar and ethanol fuel industries. Alternative or complementary crops are now being sought, in part because genetic improvement of sugarcane productivity in the field seems to have reached biological limits during the last decade (Grof and Campbell, 2001; Jackson, 2005), resulting in an increase in biomass production rather than in stem sucrose concentration (Muchow *et al.*, 1997). Because of the complexity of the sugarcane genome, sweet sorghum was identified as a

model species to explore more efficiently the genetic basis of sugar accumulation (Ritter, 2004, 2007). Sorghum and sugarcane have a high level of synteny (Ming *et al.*, 1998).

Sorghum is also increasingly considered as an alternative species to sugarcane for water-limited environments (Nasidi *et al.* 2010). The species has the advantage of being a potential multi-purpose crop providing grain for feed or food, sucrose for fuel production and stem residues for feed (FFF: Food-Feed-Fuel). This is of major concern regarding the necessity to prevent excessive competition for land and water between fuel and food/feed production. For these reasons, sweet sorghum was recently evaluated as one of the most sustainable crops for biofuel production (De Vries *et al.*, 2010).

Sorghum sweetness is a particularly complex trait. Stem sugar (mainly sucrose) concentration, usually measured at physiological maturity of the grains, has a moderate heritability and is highly prone to G x E (Genotype x Environment interactions) that are still poorly understood (Murray *et al.* 2009). In particular, the dynamic interactions between sucrose accumulation in the stem, plant phenology and grain filling remain unclear. McBee and Miller (1982) did not find any difference in the kinetics of non-structural carbohydrates (NSC) accumulation before anthesis in the stem of grain and sweet sorghum genotypes, as formerly reported by Ventre (1948). However, Lingle (1987) showed that this process may be onset earlier and that sucrose concentration in internodes increased with its distance from the apex around flag leaf stage. Hoffmann-Thoma *et al.* (1996) confirmed that sucrose storage in stems was not necessarily related to the onset of the reproductive stage, suggesting that sorghum and sugarcane may have a similar pattern of sucrose storage. This pattern could then be masked by i) the expansion of the last internodes before flag leaf stage that compete for hexoses and can delay or reduce sucrose accumulation in expanded internodes (Lingle, 1987) and ii) the onset of reproductive sinks in the plant at a variable time depending on photoperiod (Clerget *et al.*, 2008). Similarly as introduced in the companion papers, competition between grain filling and sugar storage in the stem is not fully understood (Broadhead, 1973; Ferraris, 1981; Fortmeier and Schubert, 1995; Rajendran *et al.*, 2000).

In sugarcane, sucrose storage is an active process involving a succession of enzyme activities from internode elongation to maturity (Lingle, 1999; Whittaker and Botha, 1997; Zhu *et al.*, 1997; Rae *et al.*, 2005; Grof *et al.*, 2007, Verma *et al.*, 2011). In sweet sorghum, enzymological studies provided controversial results. Invertase activities were reported by Lingle (1987) and Tarpley *et al.* (1994b), but not by Hoffmann-Thoma *et al.* (1996). Activities were low throughout plant growth whereas sucrose synthase activity was initially high and declined during sucrose accumulation, suggesting an association between sucrose accumulation and decrease in soluble sucrose-degrading enzyme activities. Sucrose-phosphate synthase was generally present but at a low and constant level.

Sucrose accumulation in sorghum stems could thus not be correlated with the activity of any enzyme. In this regard, sweet sorghum would be biochemically different from sugarcane.

We pointed out in a field experiment in Mali on 14 sweet sorghum genotypes contrasting in terms of morphology, phenology and photoperiod sensitivity that stem juice could reach brix and sugar concentration levels at flowering as high as that measured at maturity depending on the time and the C source-sink balance to flowering. Variation in sugar concentration in the stem between anthesis and grain maturity as generally low even if negatively correlated to harvest index, and poorly benefited from a panicle pruning treatment, suggesting the presence of regulatory feedbacks.

The aim of this study was to investigate the growth patterns and phenological and biochemical processes underlying sugar accumulation in the stem of sweet sorghum and particularly its competition with grain filling in a controlled environment. The sterile and fertile near-isogenic lines of the sweet sorghum cultivar IS2848 were studied under greenhouse conditions, enabling the study of the effect of grain filling on stem sugar accumulation. IS2848 is a short-cycle, photoperiod-sensitive type that was cultivated in all our field and greenhouse experiments in France and Mali. Two photoperiods (PP) were applied (12h and 13h) to modify the duration of the vegetative phase and the timing between the onset of internode elongation and panicle initiation. Glucose, fructose, starch and sucrose concentration and the activity of three key enzymes (sucrose synthase, soluble acid invertase and sucrose-phosphate synthase) were analysed in internodes. Our hypothesis was that environment effects on sorghum sweetness are mediated by variable source-sink relationships.

5.3. Materials and methods

5.3.1. Plant material and growing conditions

The two experiments were carried out in greenhouse conditions at CIRAD Montpellier, France on sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] cv. IS 2848. This cultivar was chosen due to its photoperiod-sensitivity and the existence of a sterile line (characterized by the absence of functional pollen, also called CMS for Cytoplasmic Male Sterility) that was ideal to compare two isogenic sets of plants producing, or not, grains without needing to remove the panicle (that might cause physical injury at the peduncle level).

Sterile (SP) and fertile (FP) plants were cultivated in two growth conditions. During the first experiment, seeds were sown in late December 2009 and growth conditions supplied a day/night temperature from 28/22°C (onset of experiment) to 32/24°C (end of experiment), 40-60% relative humidity (HR) and a light of 200-350 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ PAR (photosynthetically active radiation) with 13h.d⁻¹ photoperiod (13h-PP). Plants received natural daylight supplemented with irradiation from high-

pressure sodium lamps when needed. During the second experiment, seeds were sown at the beginning of January 2010 and the growth conditions were the same excepted for the light/dark regime that was 12/12h (12h-PP), i.e. one hour shorter than during the first experiment. This artificial change in day length that did not involve a change in air temperature regime and light intensity can be considered as mimicking a tropical study with two contrasted sowing dates, short (12h-PP) and long (13h-PP) photoperiod regime representing early and late sowing dates, respectively.

Seeds were sown at 2cm depth in 15 L plastic pots filled with a 1:1 (v:v) mixture of peat-based substrates Neuhaus N2 (Klasmann-Deilmann GmbH, Geeste, Germany):EGO 140 (Tref Group, Moerdijk, The Netherlands). The substrate was fertilized in ample amounts before sowing with the coated fertilizer Basacote Plus 6M (Compo GmbH & Co. KG, Münster, Germany). Sterile and fertile plants were randomly placed in the greenhouse. One seedling per pot was kept after thinning when leaf 4 emerged. Plants were watered twice a week during the first month of growth, and daily thereafter. Tillers were removed as they appeared.

Growth parameters were measured continuously using a weather station (Campbell Scientific, INC., Logan, Utah, USA). Light (PAR), air temperature and relative humidity were measured every 60 s using SPK 215 quantum sensors (Skye Instruments Ltd., Powys, UK), thermocouples and a HMP 45 AC humidity probe (Vaisala, Helsinki, Finland), respectively. Air temperature was measured at meristem level. Light sensors and humidity probe were continuously placed at whorl level.

5.3.2. Plant monitoring and harvest under 13h-PP

Four sterile and fertile plants were used for phenological observations. Four plants per harvest and per line were sampled for growth measurements and biochemical analysis for a total of six harvests: 34 and 26 days before anthesis, i.e. during the vegetative growth period, 50% anthesis, 50% milky grain (when grains of fertile plants reached their final size), 50% hard dough stage (when grains lost their green color to turn white) and physiological maturity (when grains were at black layer).

5.3.3. Plant monitoring and harvest under 12h-PP

Four sterile and four fertile plants were used for phenological observations. Four plants per harvest and per line were also sampled for growth measurements and biochemical analysis for a total of four harvests: flag leaf, 50% anthesis, 50% milky grain and physiological maturity. Flag leaf stage was defined as the time when flag leaf was fully expanded, i.e. when the ligule was visible.

5.3.4. *Plant growth measurements*

Leaf area and fresh and dry weights (70°C for 48h) of the leaf (blade and sheath), the stem, the panicle and the grains (from flowering) were determined for each plants. Stem dry weight was calculated as the difference between stem dry weight at harvest and stem sugar content. Leaf appearance, leaf senescence, leaf area and number of expanded (mature) leaves were determined twice a week. Leaf area was calculated as follows: leaf length x leaf width x 0.69. Thermal time (TT) was calculated as the difference between mean daily temperature and a base temperature of 10.8°C (Lafarge and Tardieu, 2002). Calculation of the phyllochron (time interval between the visual appearance of two successive leaves) was done with this base temperature, and because plant leaf number of the cultivar was < 20-25 leaves, it was considered constant during time when calculation was performed (Muchow and Carberry, 1990).

5.3.5. *Harvest procedure for biochemical analysis*

Sugar quantification and enzymatic activities were investigated on plants harvested for growth measurements. Plants were collected between 8:00 and 11:00. Internode sections were sampled as illustrated in Figure 5.1. Sections sampled for analysis originated from the median part of the internodes and each section was divided in two samples: one for carbohydrate quantification and the second for enzyme assays. The samples were preliminary frozen in liquid N₂ immediately after the harvest. Samples collected for carbohydrate quantification were freeze-dried (72h), ground to 100 µm particle size with a ball grinder (Mixer Mills MM301, Retsch, Germany) and stored at -20°C prior to assay. Samples collected for enzyme extraction were frozen in liquid N₂ and stored at -80°C prior to assay.

5.3.6. *Carbohydrate quantification*

Glucose, fructose and sucrose were analyzed according to Miallet-Serra *et al.* (2005). Soluble sugars were extracted from a 20 mg aliquot of ground samples incubated with 1 mL 80 % EtOH (two times) and 50 % EtOH (once) in a water bath (75°C) for 30 min. Incubations were followed by a centrifugation (10,000 rpm for 10 min). The supernatants were pooled and filtered in the presence of polyvinyl polypyrrolidone (PVPP) and activated carbon to eliminate pigments and polyphenols. After evaporation of ethanol using a Speedvac (Jouan, RC 1022 & RCT 90) for 300 min soluble sugars were resuspended in 1 mL distilled water. Glucose, fructose and sucrose were quantified by high performance ionic chromatography with pulsed amperometric detection (Dionex system). Starch contained in the non-soluble fraction of the pellet (after incubation at 75 °C) was solubilized with 0.02 N soda at 90 °C for 90 min and hydrolysed with α-amylglucosidase (35 U) in a water bath (50

°C) for 90 min after EtOH evaporation using the Speedvac (60 min). Glucose was quantified as described by Boehringer (1984) using Hexokinase and Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (HK/G6P DH) at 340 nm. The results were expressed in milligrams of equivalent glucose by gram of dry matter. Stem sugar concentration was calculated as the mean of sugar concentration in the sampled internodes.

5.3.7. Enzyme extraction and assays

Soluble acid invertase (SAI), sucrose synthase (SS) and sucrose-phosphate synthase (SPS) were extracted in a buffer A: 50 mM HEPES-KOH (pH 7.5), 5 mM MgCl₂, 1 mM Na₂-EDTA, 0.05 % (v/v) Triton X-100, 5 mM DTT and 1 tablet/10 mL buffer of Complete Mini (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany).

One gram of internode section was ground in a mortar with liquid N₂ and 10 % (v/v) PVPP after the rind was discarded to facilitate grinding. Soluble acid invertase (SAI), sucrose synthase (SS) and sucrose-phosphate synthase (SPS) were extracted from the ground material after resuspending in 2 mL extraction buffer: 50 mM HEPES-KOH (pH 7.5), 5 mM MgCl₂, 1 mM Na₂-EDTA, 0.05 % (v/v) Triton X-100, 5 mM DTT and 1 tablet/10 mL buffer of Complete Mini (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). After centrifugation (10,000 rpm for 15 min) at 4°C, the supernatant was desalted before assay through a PD-10 column (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) equilibrated with 50 mM HEPES-KOH (pH 7.5), 5 mM MgCl₂ and 1 mM Na₂-EDTA. Two mL of desalted extract was then collected. Protein concentration was determined in 50 µL of the desalted extract using the Bradford reagent with bovine serum albumin as the standard (Bradford, 1976).

SPS activity was assayed from a 100 µL aliquot of desalted extract incubated with 50 µL of distilled water and 50 µL of 200 mM HEPES-KOH (pH 7.5), 40 mM MgCl₂, 20 mM Fructose-6-Phosphate (F6P), 100 mM Glucose-6-Phosphate (G6P) and 80 mM uridine 5'-diphosphoglucose (UDPG) in a water bath (37 °C) for 60 min corrected by blank carried out with inactivated heated enzyme (5 min at 100 °C) in the same condition. SPS activity was determined from UDP synthesis and quantified in 150 µL of incubation medium using 0.25 mM NADH and 0.8 mM PEP as substrate in 100 mM Tris-HCl and 10 mM MgCl₂ (750 µL). After Pyruvate Kinase/Lactate Dehydrogenase (PK/LDH) addition the difference in absorbance at 340 nm was calculated.

SS activity (synthesis direction) was assayed from a 50 µL aliquot of desalted extract incubated with 150 µL of distilled water and 200 µL of 100 mM HEPES-KOH (pH 8.2), 30 mM MgCl₂, 40 mM fructose and 20 mM UDPG in a water bath (37 °C) for 60 min. A blank incubated without UDPG was subtracted from assay. SuSy activity was determined from UDP synthesis as for SPS activity.

SAI activity was assayed from a 100 μL aliquot of purified extract incubated with 100 μL of distilled water and 200 μL of a buffer (pH 7.5) with 100 mM citric acid, 60 mM K_2HPO_4 and 200 mM sucrose in a water bath (37 °C) for 60 min. A blank with inactivated heated enzyme was subtracted from assay. Glucose was determined spectrometrically as described above for starch quantification in 150 μL of incubation medium, 750 μL of glucose reagent and 5 μL HK/G6PDH.

5.3.8. *Gas exchange measurements*

Measurements were made on 2 cm^2 portions of the leaf below the flag leaf using a portable gas exchange fluorescence system (GFS-3000, Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Germany) between 10:00 and 14:00 in plants cultivated under 12h-PP. Light was provided by a LED light source at photon irradiance of 500 and 2000 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (saturating light condition). Leaf temperature was maintained at 28°C and CO_2 concentration at 390 ppm.

5.3.9. *Statistical analysis*

All statistical analyses were performed using SAS 9.2 (SAS Institute, Cary, NC, USA). Two-way ANOVAs with PP and line, followed by a posteriori multiple comparisons using Fisher's LSD tests, were performed to compare the morphological and phenological parameters. Because of the small number of experimental units, the assumptions of homogeneity of variance and normality were not met. The proc RANK was then used. T-tests were performed to compare gas exchange measurements under 12h-PP. A critical value of $\alpha=0.05$ was used for the tests of significance.

5.4. **Results**

5.4.1. *Effect of panicle sterility on plant phenology and phenotype*

Plant phenology and phenotype were identical between sterile and fertile isoline at both sowing dates (Table 5.1). No significant differences ($p>0.05$) between sterile and fertile plants were observed under 13h-PP or 12h-PP for duration to anthesis, leaf number, plant leaf area and stem biomass at anthesis; and plant height and stem biomass at physiological maturity. Terminal senescence was not different between sterile and fertile plants, as indicated by similar green leaf number at maturity.

At flowering, stem moisture was not statistically different between lines but it was lower ($p<0.001$) under 13h-PP (80-82%) than under 12h-PP (89%), when crop duration was shorter. At physiological maturity, stem moisture was also lower under 13h-PP than under 12h-PP, and it was on

average lower than at flowering ($p<0.001$). At maturity, stem moisture content was higher in fertile than in sterile plants ($p<0.001$) and higher under 12h- than under 13h-PP ($p<0.01$).

5.4.2. Effect of photoperiod on plant phenology

Plant growth and phenology were greatly affected by photoperiod regime (Table 5.1). Under 13h-PP, panicle initiation (PI) occurred at 75 days (925°Cd) after sowing, as compared with 40 days (500°Cd) under 12h-PP. As a result, plants flowered 96 days after sowing under 13h-PP, and 28 days earlier under 12h-PP.

5.4.3. Effect of photoperiod on leaf production and senescence

Early flowering had a significant impact on plant architecture. Under 12h-PP, plants produced 8 leaves less than under 13h-PP (Table 5.1). The PP treatment also affected the slope of leaf number vs. thermal time (Figure 5.2A), resulting in longer phyllochron under 12h-PP than under 13h-PP ($p<0.001$). Despite the significant difference in phyllochron, plants had produced after 900°Cd of growth (corresponding to the anthesis stage under 12h-PP) only one leaf less under 12h- than under 13h-PP.

Photoperiod affected the pattern of leaf senescence (Table 5.1). Under 13h-PP, 55 and 85% of the leaves were senescent at flowering and maturity, respectively. Under 12h-PP, 35 and 45% of the leaves were senescent at flowering and maturity, respectively. Green leaf area significantly decreased between flowering and maturity under 13h-PP ($p<0.001$) but not under 12h-PP ($p>0.05$). Green leaf number at maturity was significantly lower under 13h- than under 12h-PP (Table 5.1) but plants had only 16% lower green leaf area under 13h- than under 12h-PP.

5.4.4. Effect of photoperiod on stem growth

Stem growth was strongly affected by day length, and sterile and fertile plants reacted the same manner. The dynamics of stem dry matter showed three phases. The first consisted of very slow biomass gain from sowing to 700 and 850°Cd under 12h- and 13h-PP, respectively (Figure 5.2B). During this phase, the stem was only a few centimeters long and the few visible internodes (on average 5) were not yet elongated (data not shown). The second phase consisted of rapid internode elongation. During third phase, plants accumulated 80% to 90% of final stem dry biomass. The last phase, during which stem dry matter leveled off, occurred between milky grain stage and physiological maturity. The second phase lasted about 44 days under 13h-PP and only 25 days under 12h-PP, resulting in heavier stems under 13h-PP (Figure 5.2 and Table 5.1).

Conversely, photoperiod changes did not impact on plant height. No significant differences were detected in final plant height (with panicle) among neither photoperiod nor line or for photoperiod x line interaction (Table 1). Statistical analysis performed on plant height measured at flag leaf' ligula provided the same results.

5.4.5. *Sugar storage in stems*

Under 13h-PP (Figure 5.3A, B), sugars started accumulating before PI in both sterile and fertile plants. At that stage, hexoses (glucose and fructose) were more abundant than sucrose. At 26 days before anthesis (harvest 2), at about PI when 5 internodes were already elongated, the concentration in total sugars increased strongly and reached 70 to 80% of the final sugar concentration, with hexoses still dominating (ca. 200 mg.g⁻¹ DM). Then hexose concentrations decreased. They were still elevated (> 100 mg.g⁻¹ DM) at flowering but low throughout post-floral stages. Sucrose concentration increased continuously from slightly before PI until mid grain filling (milk stage) and was the dominant component of total sugars from flowering onwards. Peak total sugar concentration was observed at hard dough stage, with about 470 mg.g⁻¹ DM in sterile plants and 380 mg.g⁻¹ DM in fertile plants. The observed decrease in total sugars after hard dough stage was statistically significant in both sterile and fertile plants. Sucrose concentration also significantly decreased in sterile but not in fertile plants. Sucrose concentration at flowering and maturity was not different in both genotypes. Starch was found at maturity in all internodes of the sterile plants (Fig. 4B), with concentrations varying from 68 to 103 mg.g⁻¹ DM (from internode 1 to internode 21), representing from 20 to 34% of internode sucrose concentration. Fertile plants accumulated very little starch in internodes (Figure 5.3D).

Plants exhibited similar patterns of sugar accumulation in stems along thermal time under 12h-PP (Figure 5.3C, D), but total sugar concentrations were smaller. Hexoses peaked between PI and anthesis, and sucrose concentration started increasing after flag leaf stage. In fertile plants, total sugar concentration temporarily decreased during grain filling, and then recovered. This phenomenon was not observed in sterile plants. Starch concentration was low in both genotypes under 12h-PP (data not shown).

5.4.6. *Sugar storage at the individual internode level*

At anthesis, a positive gradient in hexose concentration was observed from the bottom to the top of the stem, whereas an inverse gradient was observed for sucrose. This was the case for both sterile (Figure 5.4A) and fertile plants (Figure 5.4C). Sucrose concentration at anthesis was high, exceeding 300 mg.g⁻¹ DM in basal internodes. Sucrose distribution and absolute values changed little

from flowering to physiological maturity, whereas hexoses largely disappeared. Sugar distribution among internodes was similar in sterile and fertile plants, with two differences. First, the top internode and the peduncle had lower sucrose concentration in fertile than sterile plants. Second, sterile plants accumulated large amounts of starch at maturity, distributed evenly across internodes. Similar patterns of sugar accumulation were observed under 12h-PP, except for a significant increase in sucrose concentration from anthesis to maturity (data not presented).

Time courses of sucrose concentration are exemplarily presented in Figure 5.5 for the bottom-most internode participating in elongation (about phytomer No 15 for 13h-PP and No 10 for 12h-PP in the order of leaf appearance). Sucrose concentration increased gradually during the 600 to 800°Cd following onset of internode elongation (corresponding to zero °Cd on the physiological age scale). Under 13-PP where internode life span was long, sucrose concentration leveled off after about 600°Cd at about 360 mg.g⁻¹ DM. Similar observations were made on other internode positions. Consequently, the sugar accumulation process in the stem was driven by internode appearance, which happens sequentially on subsequent phytomer positions. Termination of sucrose accumulation in individual internodes was not linked to flowering or any other phenological event.

5.4.7. *Sugar and dry weight yields at whole-plant scale*

Grain yield was not significantly affected by photoperiod regime (Table 5.1), despite the difference in the duration of the vegetative phase and dry matter production. Figure 6 presents the total amount of sugars on a per-plant basis measured in the stem and grains at physiological maturity. Short days significantly reduced sugar content of both grains ($p < 0.05$) and stems ($p < 0.001$), whereas sterility did not significantly affect stem sugar content ($p > 0.1$). Consequently, total sugar reserves per plant (grains plus stems) were much larger in fertile than sterile plants (Figure 5.7). While gain in total dry biomass between anthesis and maturity was ca. 60% and 120% in fertile plants under 12h- and 13h-PP, respectively, gain in sterile plants was less than 20% (Figure 5.7C, D). The absence of a panicle sink thus did not translate into greater (structural or non-structural) storage elsewhere in the plant.

5.4.8. *Gas exchange measurements*

In an attempt to explain the apparent contradiction between superior post-floral growth of fertile vs. sterile plants despite similar green leaf area, we measured leaf net photosynthetic rates around midday for 12h-PP plants at flowering and during mid grain filling, on the leaf below the flag leaf at 2000 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ PAR (500 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ PAR). At flowering, rates were, expressed in $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, 43.7 ± 3.2 SE (19.7 ± 0.2 SE) for fertile plants and 42.7 ± 1.1 SE (19.4 ± 0.5 SE) for sterile plants.

At mid grain filling, rates were 33.1 ± 1.1 (19.0 ± 1.2 SE) for fertile plants and 33.7 ± 0.9 SE (19.1 ± 0.5 SE) for sterile plants. Consequently, there was no difference in leaf photosynthetic rates between fertile and sterile plants.

5.4.9. Activity of enzymes of sugar metabolism in internode tissue

Soluble acid invertase (SAI) was high during the early development of internodes, associated with the elongation phase (Figure 5.8A, B: example of internode 17, located 6 phytomers below the peduncle under 13h-PP). During subsequent phases associated with increasing girth and sucrose concentration of internodes, SAI activity was low in both sterile and fertile plants. During the period of high SAI activity, tissue hexose concentration was high and sucrose concentration low (Figure 5.8C, D). Observations under 12h-PP were similar (data not presented). The initial peak of SAI activity was followed by a distinct maximum of sucrose synthase (SS) activity (Figure 5.8A, B), associated with a period of rapid accumulation of sucrose and decline of hexose concentration (Figure 5.8C, D). Activity of SS showed an increasing trend towards end of grain filling in fertile plants (Figure 5.7B).

Sucrose-phosphate synthase (SPS) activity was low during internode elongation. In sterile plants it then increased and remained high from flowering to physiological maturity. Trends were similar in the bottom-most investigated internode, that was already elongated at harvest 1 (data not presented) and in fertile plants but greater fluctuations were observed in the latter. The minimum of SS and SAI and maximum of SPS activity observed after flowering in fertile plants (Figure 5.8B) was also observed on other internode positions, notably on internode 21 that is located 2 phytomers below the panicle (data not presented). In general, patterns of enzyme activity were similar between sterile and fertile plants (Figure 5.8 A vs. B), and trends were also similar between different day lengths and among internode positions (data not presented).

5.5. Discussion

In the present study sugar accumulation in sorghum internodes was investigated as it relates to plant growth patterns and phenology, defining a framework of source-sink relationships in the plant. Day length was used to modify plant growth and phenology, and a pair of near isogenic lines (sterile/fertile) was used to evaluate the effect of competition for assimilates caused by grain filling. Stem sugar accumulation was found to be highly sensitive to the change in phenology caused by response to PP, but was little affected by the presence or absence of a panicle sink. Stem sugar accumulation therefore had strong G x E interactions occurring during pre-floral stages, but had little competition with grain filling after flowering.

5.5.1. *Photoperiod affected plant morphogenesis, architecture and phenology*

Consistent with theory for photoperiod-sensitive cultivars such as IS2848 (Muchow and Carberry, 1990; Clerget *et al.*, 2004), short days reduced the time from emergence to panicle initiation (Table 5.1), a finding formerly reported in tropical field conditions based on sowing date experiments (Clerget *et al.*, 2008). In contrast to Muchow and Carberry (1990) and Craufurd and Qi (2001) who reported sorghum phyllochron to be unaffected by sowing date, short days significantly increased phyllochron in this study (Table 5.1). This is consistent with findings of Vaksman *et al.* (1998) and Clerget *et al.* (2008) and with field results in Mali in particular on IS2848 (companion papers). Nevertheless, this difference in phyllochron accounted only for a difference in leaf number of 1.6 units after 10 weeks of growth, as compared to an overall effect of day length on leaf number of 7 units. The impact of variable duration of the vegetative phase thus was more important for organogenesis than development rate.

The increased phyllochron was in part responsible for the small green leaf dry matter under short days, on average only one-third of that of 13h-PP plants. Lack of photo-assimilates caused by low leaf area may have contributed to low sugar production during stem elongation under short days. In fact, Clerget *et al.* (2008) attributed the extremely low productivity of grain sorghums when sown late in summer in West Africa to poor leaf area development caused by long phyllochron.

5.5.2. *The onset of sucrose accumulation is driven by age of internodes and not directly by plant phenology*

The final number of elongated internodes was strongly reduced from 13 (11 internodes) to 12h-PP (5 internodes) because of a reduced vegetative phase duration. Also, internode elongation set on at a different phenological stage under the two day length conditions (Figure 5.2B), confirming that stem elongation and floral induction are independent processes (Clerget *et al.*, 2008). Under 13h-PP, the rank of the first expanding internode was 13 and panicle initiation occurred once the internodes 16 or 17 had already expanded. By contrast, under 12h-PP, the onset of internode elongation was almost synchronized with panicle initiation and the rank of the first internode to expand was 6. Under 13h-PP, all internodes (but not the peduncle) had reached their final length at flag-leaf stage as described by Vanderlip and Reeves (1972), but between two and three internodes were still elongating under 12h-PP. Surprisingly, the longer vegetative phase under 13h-PP did not increase plant height (Table 5.1) as commonly observed (e.g., Miller *et al.*, 1968), but instead induced shorter internodes and increased stem diameter and rigidity (data not presented). We have no information on whether this observation was due to genotype or the specific experimental environment.

5.5.3. *However sugar accumulation in plant stem was sensitive to plant phenology*

It has been reported that sugar accumulation in sorghum stems begins at flowering (Ventre, 1948; McBee and Miller, 1982) or between flag-leaf stage and flowering (Lingle, 1987). In the present study, at the whole-plant level, the accumulation of sucrose in stems began at the onset of stem elongation and continued until the grain filling period (Figure 5.3), and then it stopped probably depending on source-sink balance rather than on plant phenology. This is in agreement with the field experiments presented in Gutjahr *et al.* (companion papers) showing that high amounts of sugar could be already stored at anthesis. However, sugar accumulation pattern under 12h-PP on sterile plants resembled that reported by McBee and Miller (1982) and Lingle (1987): sucrose concentration only attained one-third of final values at flowering and kept increasing afterwards until physiological maturity. This suggests that this process is subject to strong G x E interactions, notably the effects of day length on source-sink relations for carbohydrates, i.e. on the duration of the vegetative phase and phytomer number, the onset on internode elongation and of grain filling. As a result, at flowering, stem sucrose concentration was 2.7-fold higher in 13h-PP than 12h-PP plants, and the latter only reached the flowering concentration of 13h-PP plants at their physiological maturity (Figure 5.3). In absolute terms, 13-PP plants accumulated much more sugar than 12h-PP plants (Table 5.1) because of greater structural growth (number of phytomers) and leaf area production.

Our results are in agreement with Hoffman-Thoma *et al.*, (1996) and showed that sucrose concentration in a given internode set on at, or shortly after, internode elongation of the subsequently appearing internodes (Figure 5.3). It was initially associated with high hexose concentrations (Figure 5.3) as commonly found in other cereals (Evans and Wardlaw, 1976). While hexoses disappeared gradually, sucrose accumulated continuously over a long period (600-800°Cd). Starch accumulated substantially only after flowering, and only in the absence of a fertile panicle exerting a sink (Figure 5.4).

5.5.4. *No grain does not necessarily mean more sugars*

In contrast to grain sorghum (Fisher and Wilson, 1975; Muchow and Wilson, 1976), little attention has been paid to the competition for photo-assimilates between stems and grains in sweet sorghums. Available information is contradictory. In the field, higher sucrose concentrations in stems after panicle pruning were reported by Broadhead (1973) and Balole (2001), but such an increase was not found by Rajendran *et al.* (2000) in ten sweet sorghum cultivars. The comparison of two sterile and fertile lines by Fortmeier and Schubert (1995) confirmed that stem reserves do not systematically benefit from the absence of the panicle sink. In the present study, the two contrasting responses were observed. Under 13h-PP, sterile and fertile plants attained the same sucrose

concentration at maturity, but sterile plants accumulated greater starch in stems than plants producing grain. By contrast, early flowering and poor leaf area production under 12h-PP did not allow much sucrose accumulation before flowering (Figure 5.3C, D) and even led to stagnation of sugar accumulation during grain filling, followed by renewed accumulation after grain filling. These findings confirm the potential competition for carbohydrates between storage in the stem and grain filling. However, competition does not happen if the environment permits sufficient build-up of leaf area and sugar storage before flowering.

Interestingly, sterile plants, despite the absence of a panicle sink, did not produce more stem or leaf material than fertile plants, nor did they maintain more green leaves (Table 5.1) or accumulate significantly more stem reserves. In fact, sterile plants produced significantly less above-ground DW than fertile plants at maturity (Figure 5.7), although no such difference was observed at flowering. Thus, sterile plants could not use the excess photo-assimilates into growth. The fact that sterile plants accumulated starch in stems (Figure 5.4), in contrast to fertile plants, indicates that assimilates were abundant in sterile plants at post-floral stages. This confirms the results we obtained in the field on 14 sweet sorghum genotypes (companion paper), showing an overall low benefit of panicle pruning on sugar accumulation in the stem at flowering.

Given the observation that post-floral growth was much smaller in sterile vs. fertile plants, whereas green leaf area was about the same, it appears that sterile plants were lacking sinks to use the excess assimilate, resulting either in reduced leaf assimilation rates or assimilate loss by other mechanisms. Feed-back inhibition of photosynthesis activity by absence of sinks (end product inhibition), that is well known in plants (Paul and Foyer, 2001) including sugarcane (McCormick *et al.* 2006), was suggested to be responsible of the lack of increase in sucrose concentration in stems of sterile (Fortmeier and Schubert, 1995) or pruned (Rajendran *et al.*, 2000) sorghum plants. However, the photosynthesis measurements made on 12h-PP plants did not indicate such a feedback in IS2848. Broadhead (1973) and Rajendran *et al.* (2000) suggested that an excess of assimilates could be allocated to tiller production, but in this study tillers were only produced during the vegetative phase and removed as they appeared. Excess assimilates can also result in an increase of stem diameter and in a reduction in fiber content in sweet sorghums (Ferraris, 1981; Rajendran *et al.*, 2000) or in an increased allocation of assimilates to other organs, such as roots (Fisher and Wilson, 1975). In our study, the large post-floral growth deficit in sterile plants was only measured above-ground, but it is impossible that an equivalent gain in root growth could have been accommodated in the restricted soil volume in the pots. Consequently, contrasting findings in the literature on sugar accumulation patterns in sorghum are probably due to genotypic differences (namely, crop duration and PP sensitivity) and environment (namely, PP) (Ventre, 1948; McBee and Miller, 1982; Lingle, 1987;

Hoffman-Thoma *et al.*, 1996). For example, the longer vegetative phase and the higher pre-floral sugar accumulation of cv. Keller in the greenhouse (Hoffman-Thoma *et al.*, 1996) compared to field (Ali *et al.*, 2008) could thus be explained by the very long PP (16h) used by the former. The growth deficit might also suggest higher respiration rates (Archbold, 1945; Goldsworthy, 1970) in sterile plants, and possibly the activation of alternative respiration pathways (luxury respiration), allowing the plants to cope with the excess assimilates due to the source-sink imbalance (Azcón-Bieto *et al.*, 1983; Sieger *et al.*, 2005). Whatever the fate of the unused assimilates in sterile plants, our results suggest that for the design of new sorghum ideotypes for sugar and/or biomass production, it is important to provide for sufficient post-floral sink capacity.

5.5.5. *Role of different sugars and of sucrose-metabolism related enzymes*

Sucrose was quantitatively the most important sugar accumulated in sorghum stems, potentially building up during the entire period from early stem elongation to physiological maturity. Sucrose is known to be the main storage sugar in sorghum (Anglani, 1998). Hexoses, by contrast, accumulated temporarily but in high concentrations during internode elongation and early phases of sucrose accumulation. Starch, lastly, only accumulated under conditions of post-floral sink limitation (absence of grain filling). The three components thus seem to have different physiological functions.

Activities of SAI, SS and SPS enzymes in internodes did not show any significant differences between sterile and fertile plants (Figure 5.8), but their dynamics appeared to be related to elongation and storage processes: SAI activity was only high during elongation (when hexose concentration was high), SS during rapid sucrose accumulation (with hexose concentration decreasing), and SPS throughout internode development after completion of elongation, and especially after flowering. Lingle (1987) and Tarpley *et al.* (1994b) reported that internode elongation was found to be related to high invertase and SS activities that decreased after elongation ceased. Hoffman-Thoma *et al.* (1996) did not find any invertase activities possibly because no measurements were done after flowering. A decline in activities of sucrose-degrading enzymes was considered a necessary condition for sucrose accumulation in sweet sorghum stem. Neither these studies nor the present one, however, could establish a clear association of any of the three enzymes with the sucrose storage process. SS activity, essential for sucrose synthesis, declined shortly after onset of sucrose accumulation in internodes whereas accumulation continued. These results are in agreement with Hoffman-Thoma *et al.* (1996), who suggested that a decrease in SS activity is necessary for the onset of sucrose accumulation. Possibly, as indicated by high initial hexose concentration and SAI activity, sucrose that is transported to internodes (Tarpley and Vietor, 2007) is cleaved during structural growth to fuel cells. The high SS activity observed during the subsequent

early phase of sucrose accumulation may serve to convert excess hexoses into sucrose for storage. Thereafter, the bulk of sucrose accumulated in internodes does probably not involve biochemical transformation and is imported directly into internode parenchyma cells. Suitable biochemical markers for this process should therefore be carriers and not enzymes (Lingle, 1987; Tarpley *et al.*, 1994b; Hoffmann-Thoma *et al.*, 1996; Tarpley and Vietor, 2007). However the genotypic variability we observed regarding the benefit of panicle pruning on sucrose accumulation in the stem between flowering and maturity as well as the negative relationship of the latter process with harvest index (companion paper) suggests that it would be interesting to address these enzymatic processes on a wider range of genotypes.

5.5.6. *Comparison of sucrose accumulation in sweet sorghum and sugarcane*

Genetic improvement of sugarcane sucrose production seems to be facing a limit (Grof and Campbell, 2001; Jackson, 2005) but physiological processes of sucrose accumulation are not yet well understood (Uys *et al.*, 2007; Inman-Bamber *et al.*, 2009, 2010; McCormick *et al.*, 2009). High-sugar genotypes have high SPS activity according to Grof *et al.* (2007) and Verma *et al.* (2011) but not according to Lingle and Tew (2008). Low-sugar genotypes do not necessarily have lower photosynthetic rates than high-sucrose genotypes (McCormick *et al.*, 2009; Inman-Bamber *et al.*, 2009) and sucrose content was shown to increase to levels as high in low- than in high-sucrose clones in some internodes (Inman-Bamber *et al.*, 2008, 2009), suggesting that high- and low-sucrose clones could store the same amount of sugars in stems (Inman-Bamber *et al.*, 2010). Number of shoots and tillers per clone (Inman-Bamber *et al.*, 2009) and growing conditions (drought and temperature; Inman-Bamber *et al.*, 2009, 2010) were also recently reported to alter source-sink balance and, thus, sucrose content in sugarcane stems.

This study showed that sweet sorghum and sugarcane may have a similar pattern of sucrose storage. But to validate this hypothesis certain conditions need to be met: utilize long-cycle sorghums or photoperiod-sensitive varieties under long growth cycles, i.e. study sorghum genotypes morphologically closer to sugarcane. Sink-source relationships can be expected to be different in the green-revolution type short-cycle sorghums and PP-sensitive sorghums, the latter being less well studied. Their behavior may be closer to sugarcane and their potential large under suitable conditions. Ritter (2007) suggested that sorghum may serve as a model for sugarcane. However, in sweet sorghum as well as in sugarcane, there is a lack of reliable biochemical and physiological markers for the sucrose accumulation process. Such markers may be particularly useful in sorghums which are complex systems because of competition between the stem and the panicle. Hence, further investigations are necessary to better understand the regulatory feedbacks.

The specificities of sweet sorghums, as compared to sugarcane, are (1) their potential for multiple production objectives (biomass or forage, soluble sugars, grain) that seem to have surprisingly little trade-offs because of limited competition between sugar and grain production, (2) the high phenotypic plasticity conveyed by photoperiodism, (3) low water requirements, and (4) the annual phenology and short cycle of the crop. The present study indicates that in photoperiod-sensitive sweet sorghums, sugar accumulation is much more environment dependent than grain production and can this be expected to have strong G x E interactions. Our field results (companion papers) confirmed that the photoperiod sensitivity of sorghum would be a strong advantage to maximize biomass and sugar production while not penalizing grain yield. This, in turn, opens opportunities for the improvement of dual purpose sorghum crops. This may involve the development of better ideotypes and the adjustment of cultural practices to better optimize G x E x M (M for management).

Table 5-1. Mean values \pm SE of some morphological and phenological parameters and results of the two-way ANOVAs testing effects of photoperiod (PP) and line on sterile (SP) and fertile (FP) plants grown in the controlled environments in CIRAD, Montpellier France under 13h- and 12h-PP. Stem dry weight represents both structural and non-structural fractions of the stem. Probabilities: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, NS = not significant.

Parameters	13h-PP		12h-PP		Analysis of variance		
	SP	FP	SP	FP	PP	Line	PP x Line
FLOWERING							
Time to flowering (d)	95 \pm 1	97 \pm 1	69 \pm 1	68 \pm 1	***	NS	NS
Mean phyllochron ($^{\circ}\text{Cd} \cdot \text{leaf}^{-1}$)	55 \pm 2	55 \pm 1	61 \pm 2	61 \pm 1	***	NS	NS
Total leaf number	23 \pm 1	22 \pm 1	14 \pm 0	14 \pm 0	***	NS	NS
Green leaf number	9 \pm 1	11 \pm 1	8 \pm 1	10 \pm 1	NS	NS	NS
Leaf area (cm^2)	3357 \pm 557	3777 \pm 271	2365 \pm 114	2260 \pm 161	***	NS	NS
Leaf dry weight (g)	45 \pm 5	41 \pm 7	16 \pm 1	13 \pm 1	***	NS	NS
Stem dry weight (g)	38 \pm 5	31 \pm 6	15 \pm 1	12 \pm 2	***	NS	NS
Stem moisture (%)	80 \pm 1	82 \pm 1	89 \pm 1	90 \pm 0	***	NS	NS
MATURITY							
Time to maturity(d)	137 \pm 0	137 \pm 0	98 \pm 0	98 \pm 0	***	NS	NS
Plant height with panicle (cm)	154 \pm 7	156 \pm 8	162 \pm 1	158 \pm 4	NS	NS	NS
Plant height at last ligula (cm)	121 \pm 5	138 \pm 16	122 \pm 1	115 \pm 5	NS	NS	NS
Number of elongated internodes	11 \pm 0	11 \pm 0	9 \pm 0	9 \pm 0	***	NS	NS
Green leaf number	4 \pm 1	4 \pm 1	8 \pm 0	7 \pm 1	***	NS	NS
Leaf dry weight (g)	41 \pm 4	41 \pm 2	13 \pm 1	15 \pm 1	***	NS	NS
Stem dry weight (g)	55 \pm 4	47 \pm 4	19 \pm 0	18 \pm 2	***	NS	NS
Stem moisture (%)	74 \pm 1	81 \pm 1	82 \pm 1	85 \pm 1	***	**	NS
Grain dry weight (g)	0 \pm 0	34 \pm 4	0 \pm 0	29 \pm 2	NS	***	NS
Sucrose yield ($\text{g} \cdot \text{plant}^{-1}$)	16 \pm 1	13 \pm 2	5 \pm 1	4 \pm 0	***	NS	NS

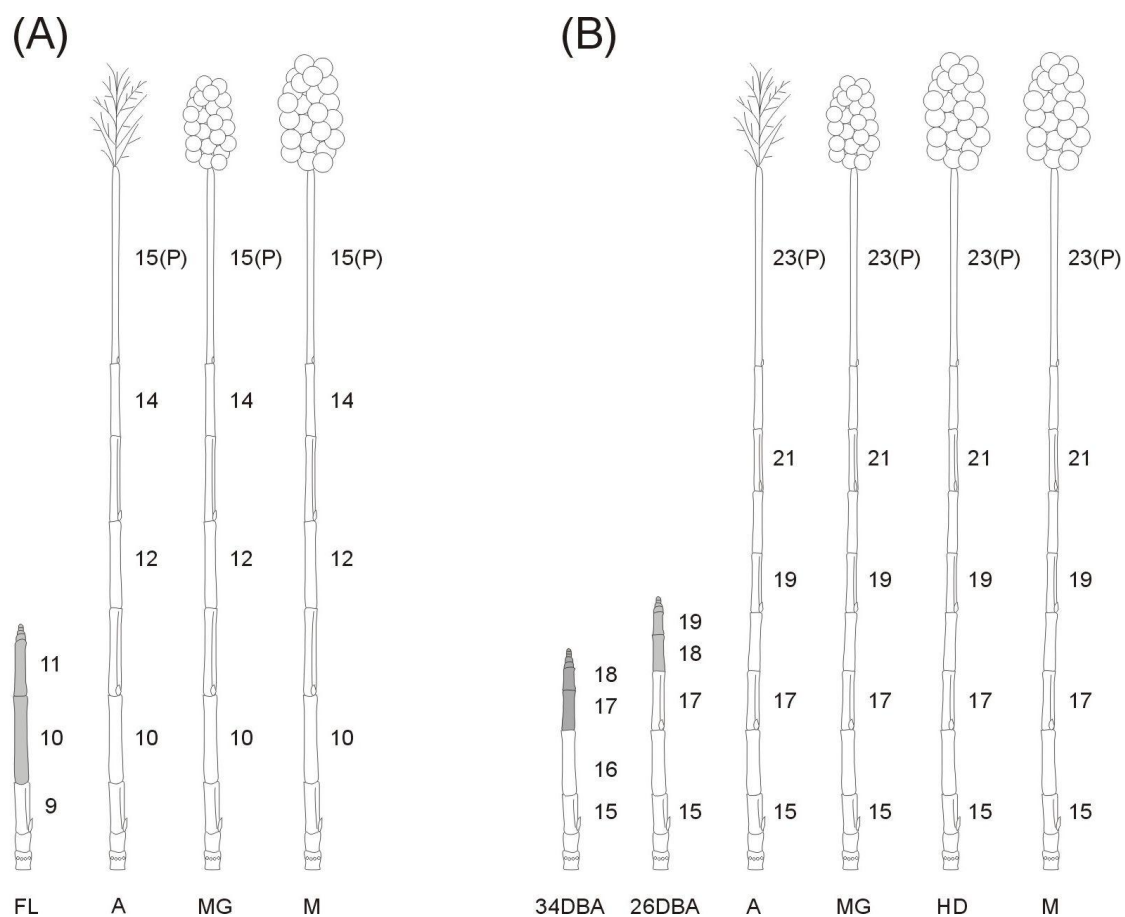


Figure 5-1. Morphology of sorghum stems at the time of sampling for biochemical analyses under 13h- (A) and 12h-PP (B). Numbered internodes where those sampled. Internodes not colored grey are fully elongated. Developmental stages at sampling were flag leaf (FL), anthesis (A), milky grain (MG) and grain maturity (M). Under 13h-PP, samplings were also done at 34 and 26 days before anthesis (DBA) and hard dough stage (HD).

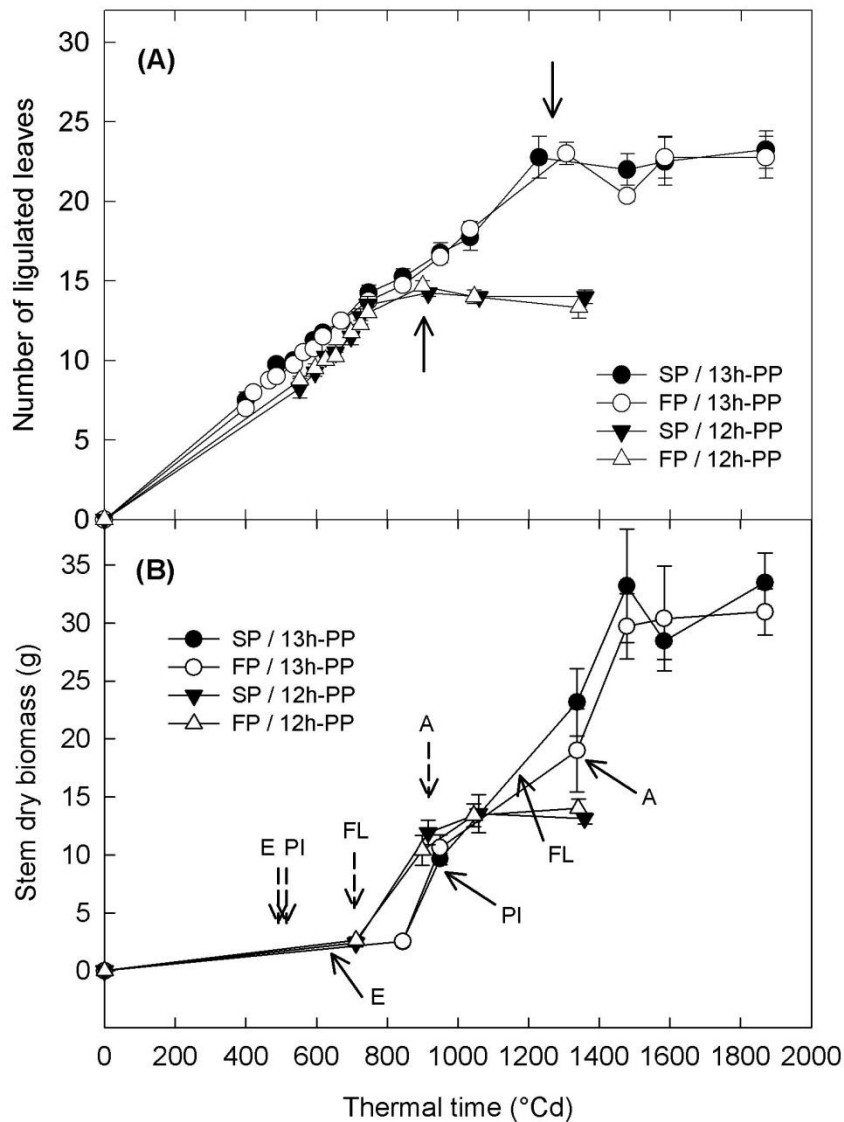


Figure 5-2. Effect of photoperiod on sterile (SP) and fertile (FP) plant growth. (A) Time course of the average number of ligulated leaves under 13h-PP (circles) and 12h-PP (triangles) in sterile (open symbols) and fertile (closed symbols) plants. The arrows indicate the phenological stage of 50% anthesis. (B) Average stem (structural fraction) growth kinetics of fertile plants grown under 13h-PP (circles) and 12h-PP (triangles) from sowing to grain maturity. Arrows indicate the stages of onset of stem elongation (E), panicle initiation (PI), flag leaf (FL) and anthesis (A). Dashed arrows characterize the 13h-PP plants. Solid arrows represent the 12h-PP plants. Data are means of four plants \pm SE and originate from plants grown in greenhouse in Montpellier, France.

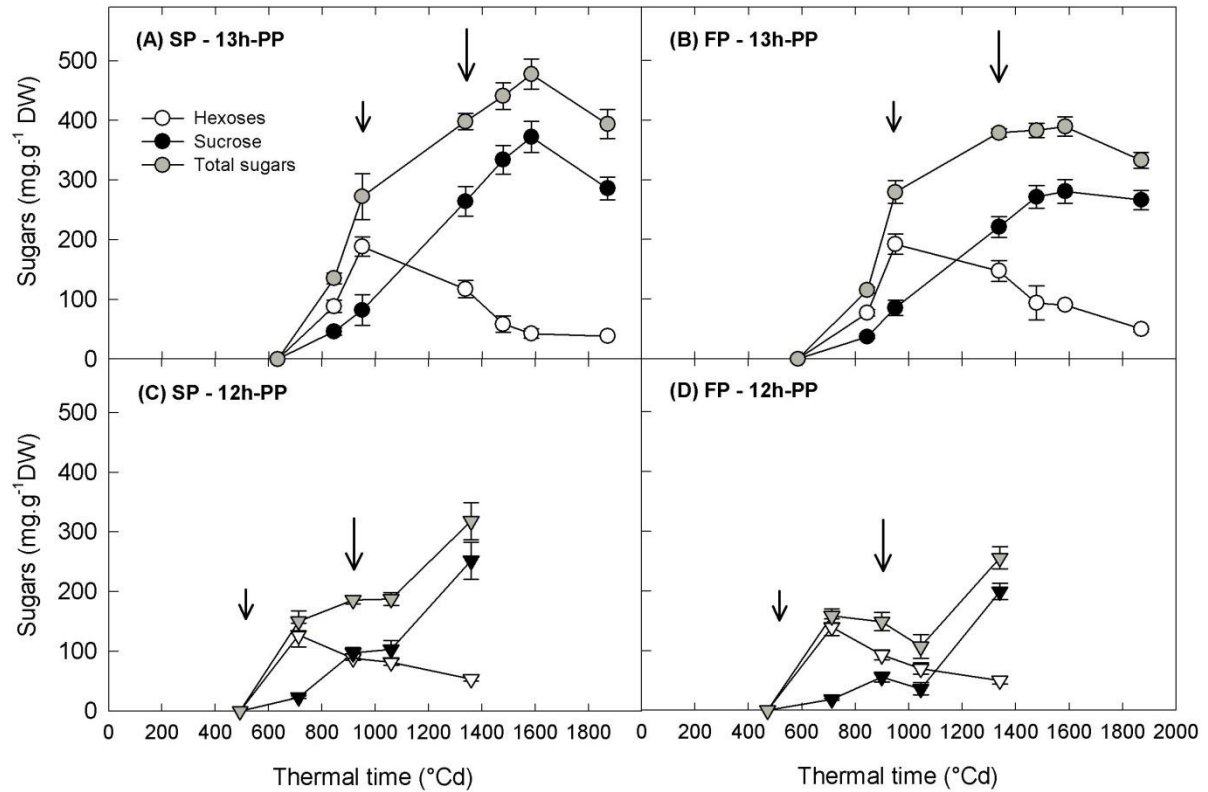


Figure 5-3. Time-course of stem sugar concentrations in sterile (SP) and fertile (FP) plants expressed in thermal time. Concentrations in hexoses (white symbols), sucrose (black symbols) and total sugars (grey symbols) are illustrated for the 13h (A, B; circles) and the 12h (C, D; triangles) photoperiod regime. Sugar accumulation was represented to start from the onset of elongation of the first visible internode. Short and long arrows represent PI and anthesis stages, respectively. Data are means of four plants \pm SE.

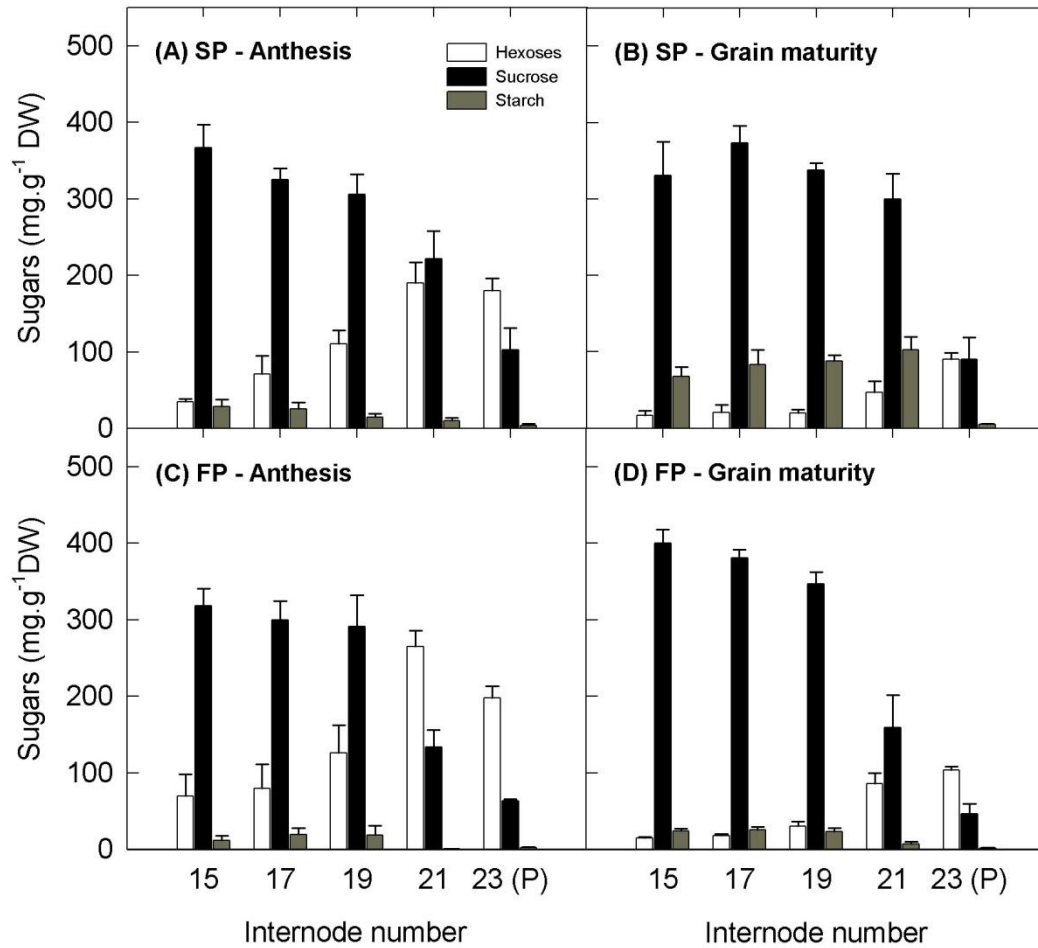


Figure 5-4. Dynamics of the concentrations in hexoses (white bars), sucrose (black bars) and starch (grey bars) at anthesis (A, C) and grain maturity (B, D) in sterile (SP; A, B) and fertile (FP; C, D) plants grown under 13h-PP. Data are means of four plants \pm SE.

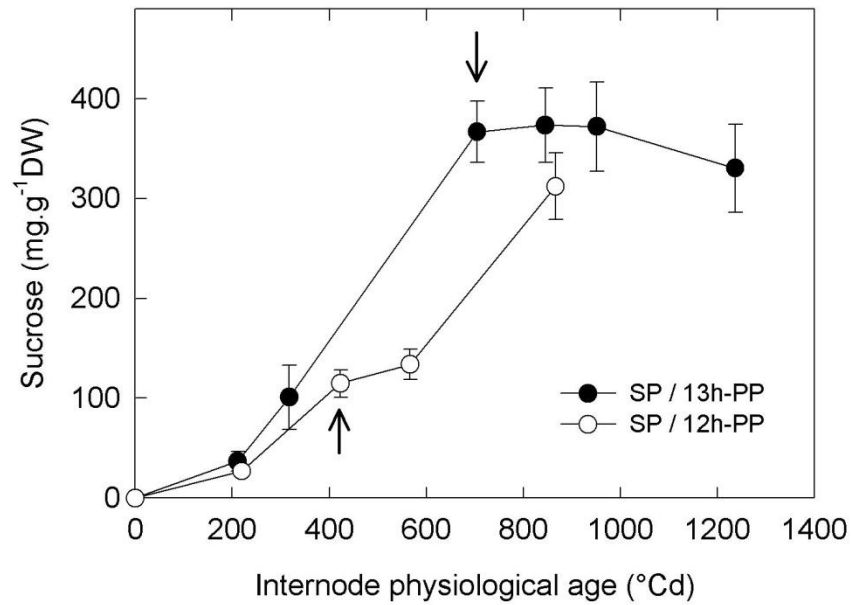


Figure 5-5. Time-courses of sucrose concentration in the bottom-most sampled internode in sterile plants (SP), i.e. in internode 15 and 10 in plants grown under 13h- (closed symbols) and 12h-PP (open symbols), respectively. Data are means of four plants \pm SE and are expressed in thermal time from the onset of its elongation. Arrows represent anthesis stage.

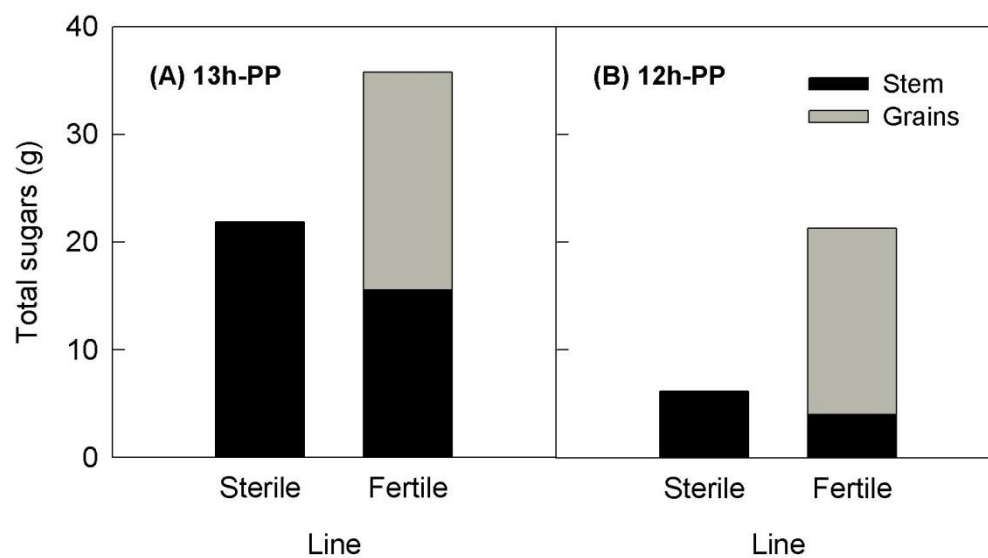


Figure 5-6. Total (soluble + starch) sugar content in the stem of sterile and fertile plants (black) and grains of fertile plants (grey) when grown under 13h- (A) and 12h-PP (B). Data are means of four plants.

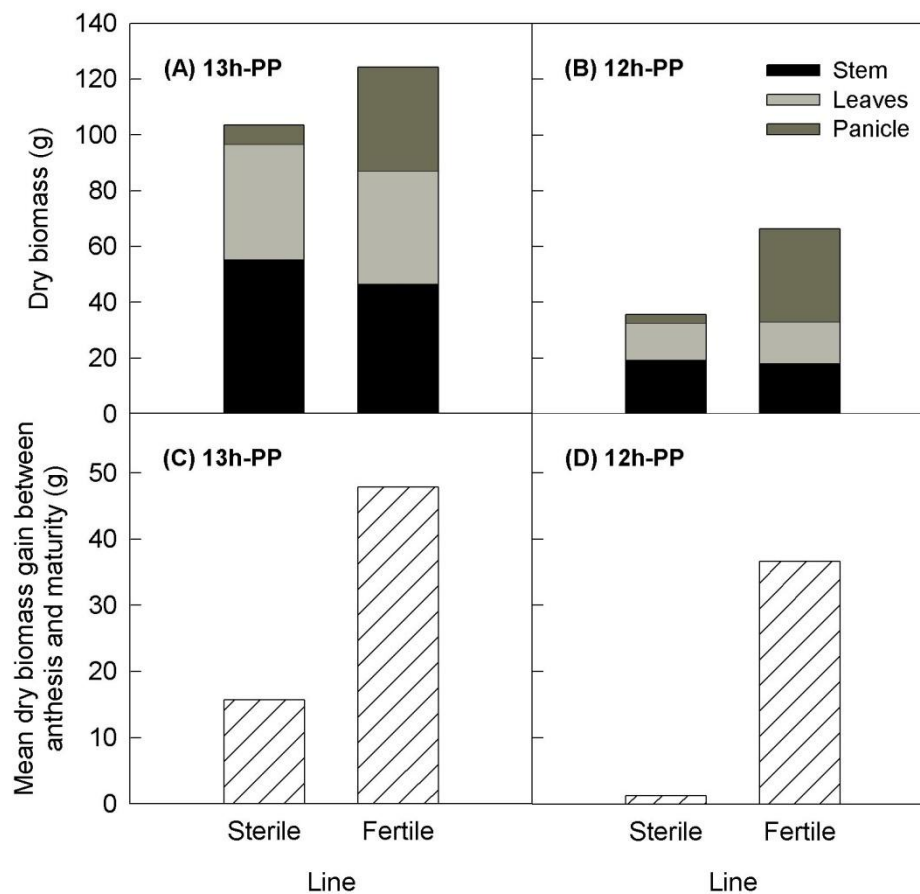


Figure 5-7. Stem, leaves and panicle dry biomass at grain maturity in sterile (SP) and fertile (FP) plants under 13h- (A) and 12h-PP (B), and plant dry biomass gain between anthesis and grain maturity in sterile and fertile plants under 13h- (C) and 12h-PP (D). Data are means of four plants.

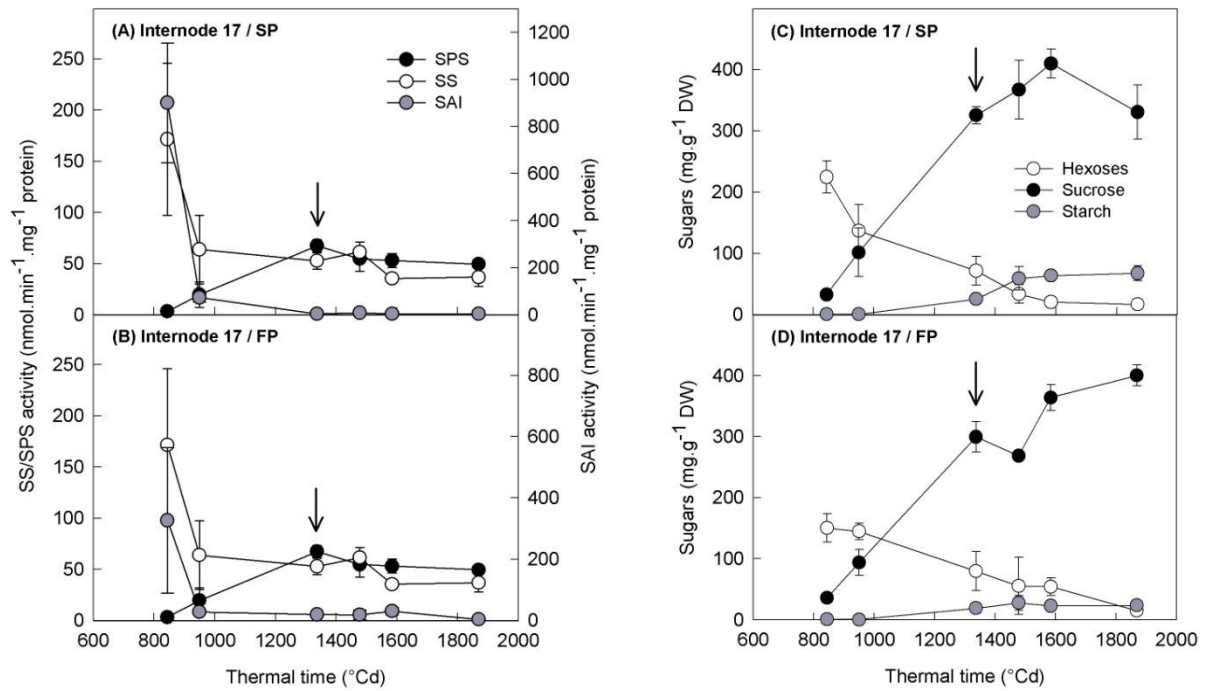


Figure 5-8. Time-courses of soluble acid invertase (SAI), sucrose synthase (SS; sucrose synthesis direction) and sucrose-phosphate synthase (SPS) activities, and hexoses, sucrose and starch in internode 17 in sterile (SP; A, C) and fertile (FP; B, D) plants grown under 13h-PP. Internode 17 was in elongation during the first harvest (840°Cd) and elongated thereafter. From harvest 3 (anthesis), E4 is fully expanded. Data are means of four plants \pm SE. Arrows represent anthesis stage.

Chapitre 6

Discussion générale

Cette thèse avait pour objectif d'étudier la dynamique d'accumulation des glucides dans la tige chez les variétés sucrées de sorgho et les relations entre production de glucides, de grains et de biomasse structurale. La méthodologie suivie consistait en l'étude de variétés contrastées au niveau de caractères clés dans les relations source-puits de carbone tels que le rendement en grains, la biomasse de tiges et de feuilles produite, la durée du cycle de croissance, la sensibilité à la photopériode et la concentration en glucides des entrenœuds estimée par le brix (représentative de la concentration en glucides dans le jus extrait) ou dosée par analyse biochimique, selon les expérimentations. Les expérimentations réalisées au champ et en serre nous ont permis d'évaluer le potentiel des variétés étudiées pour une utilisation en tant que culture double usage (grain/jus sucrés) et, de mieux cerner les mécanismes de l'accumulation des glucides à l'échelle de la plante et des entrenœuds. Les phases expérimentales sur le terrain en Afrique nous ont permis de cultiver des variétés de cycle long, donc des variétés de très grande taille et/ou de biomasse de tige très élevée. La diversité phénotypique observée a fait ressortir certains traits d'intérêt pour les idéotypes recherchés mais rarement ceux abordés dans la littérature ou de façon isolée et non intégrée dans le système des relations source-puits de la plante entière. Ces caractères s'avèrent aujourd'hui pertinents dans une démarche de modélisation mais aussi de phénotypage pour des études sur la génétique des déterminants des rendements en glucides et grains chez les sorghos.

6.1. Discrimination des plantes pour les caractères sucré et juteux de la tige

6.1.1. Limite du brix pour le phénotypage du caractère sucré des plantes

Les deux techniques les plus utilisées pour mesurer la concentration en glucides dans le jus des variétés sucrées de sorgho sont la mesure du brix au champ et l'analyse en laboratoire par colorimétrie ou chromatographie liquide haute performance. Le brix évalue le pourcentage de matière sèche solide en solution par réfractométrie ; chez des espèces sucrières comme la canne à sucre ou le sorgho sucré, il est estimé qu'un degré brix (1°B) représente 1g de glucides pour 99g d'eau. Il s'agit de mesurer à l'aide d'un réfractomètre optique ou numérique l'indice de réfraction du jus extrait qui est affiché en °B après compensation de la température. Cette technique est couramment utilisée pour d'autres espèces cultivées comme le melon ou le raisin. La technique de chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) est beaucoup plus précise et permet une séparation des composés de l'extrait. Ainsi, en plus de mesurer la concentration réelle en glucides totaux, elle permet de mesurer la composition exacte du jus. Le brix a toutefois l'avantage d'être une mesure rapide, peu onéreuse et réalisable sur le terrain. Au cours d'expériences impliquant des dispositifs expérimentaux de grande taille, il est probablement la meilleure

alternative car quelques gouttes de jus suffisent à obtenir une mesure très fortement corrélée à la concentration réelle mesurée en laboratoire (Guigou *et al.*, 2011). Cette méthode a été utilisée, entre autres, par Broadhead (1973), Ferraris (1981), Rajendran *et al.* (2000), Ali *et al.* (2008), Ritter *et al.* (2008), Makanda *et al.* (2009a, b) et Murray *et al.* (2009). C'est celle qui a été utilisée dans nos essais au Mali lors des deux années d'étude.

Estimer le caractère sucré d'une plante à partir de sa mesure de brix sur le terrain implique cependant la prise de certaines précautions. La mesure de brix est réalisée à partir d'une goutte de jus, donc sans prendre en considération le volume total de jus dans la plante. Cette mesure en elle-même ne donne donc aucune indication de la quantité de glucides dans la tige. Une variété peut ainsi présenter une valeur de brix très élevée et ne pas être juteuse, donc avoir un rendement quasi nul en jus sucré. Sans possibilité de vérifier les mesures de brix par un dosage en laboratoire des glucides au niveau des entrenœuds, il est indispensable d'étudier des variétés le plus homogène possible en termes de jutosité (voir section 1.1.2). Enfin, il existe une certaine hétérogénéité au niveau de composition (teneur en fibres, jutosité) et de l'âge des entrenœuds. Ainsi lorsque les mesures sont réalisées sur ces derniers, et non sur le jus extrait de toute la tige, il faut veiller à ce que les analyses portent sur les mêmes niveaux d'entrenœuds.

Cette mesure peut également prêter à confusion lorsqu'elle est utilisée pour suivre la concentration en sucres dans la plante à plusieurs stades, ce qui fut le cas dans les études de Broadhead (1973), de Ferraris (1981), de Makanda *et al.* (2009a), et très certainement dans bien d'autres études de terrain qui n'ont pas été publiées. En effet, l'humidité de la tige varie dans le temps ; en l'occurrence elle diminue avec la maturité de la tige chez le sorgho. A quantité égale de glucides stockée dans une tige à floraison et à maturité, la valeur de brix augmente donc naturellement entre ces deux stades étant donné que la tige contient moins d'eau à maturité. Makanda *et al.* (2009a) ont noté une augmentation du brix entre les récoltes à floraison et à maturité chez un grand nombre des variétés étudiées. De leurs analyses, ils ont pu conclure que ces variétés avaient de bons rendements en grains et en sucres, et que le brix à floraison pouvait être un indicateur de la valeur de brix à maturité. En raisonnant en termes de brix, nous aurions trouvé des résultats similaires et nous aurions aussi conclu à une augmentation de la concentration en glucides entre les deux stades (les données n'ont pas été présentées dans ce travail). En raisonnant en termes de quantité de glucides par poids sec de tige (et donc en nous affranchissant du biais induit par la quantité d'eau dans la tige), les résultats deviennent très différents. L'augmentation de concentration entre floraison et maturité n'est plus visible (Figure 4.3), ainsi que la relation (positive) entre la concentration aux deux stades (Tableau 4.2). Il n'est alors plus possible de conclure que les tiges sont capables d'accumuler des glucides alors même que les grains sont en train de se remplir.

Makanda et ses collaborateurs s'en sont certainement rendus compte car un indice pour quantifier le caractère sucré et juteux est proposé par Makanda et al. (2009b).

Le problème se pose enfin dans les études qui ont abordé la question de la compétition entre le stockage de glucides dans la tige et le rendement en grains (Broadhead, 1973 ; Ferraris, 1981 ; Rajendran *et al.*, 2000). La technique employée, qui consiste à couper la panicule, a un impact sur la quantité de jus extraite. La valeur de brix en est donc affectée (cf. section 6.7).

6.1.2. *Jutosité, couleur de la nervure et rendements en sucres*

Afin de sélectionner les variétés destinées à nos essais en champ, une phase d'analyse de la base de données disponible a été réalisée et ainsi a permis de comparer les variétés de la *core collection* de sorgho au Cirad. Cette stratégie a orienté le choix des variétés uniquement sur les critères disponibles dans cette base, donc sans biais provoqué par la connaissance de celles-ci, ou la disponibilité de photographies. La très forte diversité phénotypique observée nous a permis de constater l'importance d'un premier critère à considérer dans le choix des variétés : la couleur de la nervure. Les sorghos présentent généralement une couleur de nervure qui varie du blanc au vert (Figure 6.1), en passant parfois par une couleur se rapprochant du jaune. Plus rarement, certaines variétés possèdent une nervure brune, conséquence d'une mutation entraînant une réduction de lignification de la plante (Sattler *et al.*, 2010), mais nous n'en avons pas dans nos essais. La nervure blanche (NB) est caractéristique d'une nervure non juteuse et la nervure verte (NV) d'une nervure juteuse. Cette relation entre la jutosité et la couleur de la nervure se retrouve au niveau de la tige (Figure 6.1). Les variétés à NB présentent donc des entrenœuds très peu juteux alors que ceux des variétés à NV sont extrêmement juteux (Doggett, 1988).

La couleur de la nervure est donc un trait qui a une incidence directe sur la qualité du phénotypage des variétés pour le caractère sucré lorsque celui-ci est réalisé au champ à l'aide d'un réfractomètre. En effet, il n'est pas rare de mesurer des valeurs de brix très élevées chez les variétés à NB (supérieures à 18°B dans nos essais au Mali). Cependant, sans mesure de jutosité de tige, la valeur de brix ne renseigne pas sur le rendement en jus sucré extractible de la plante étant donné que généralement moins d'eau est extractible de ces variétés que des variétés à NV. Lors du phénotypage des variétés à NB, il est toutefois préférable de vérifier la quantité d'eau extractible en pressant toute la tige plutôt que de caractériser la jutosité de la variété sur le seul critère de l'entrenœud. Nous avons en effet remarqué que la quantité de jus produite dépendait du nombre et de la taille des entrenœuds, car ceux-ci sont toujours juteux, indépendamment de la variété (ces données n'ont pas été intégrées dans ce travail).

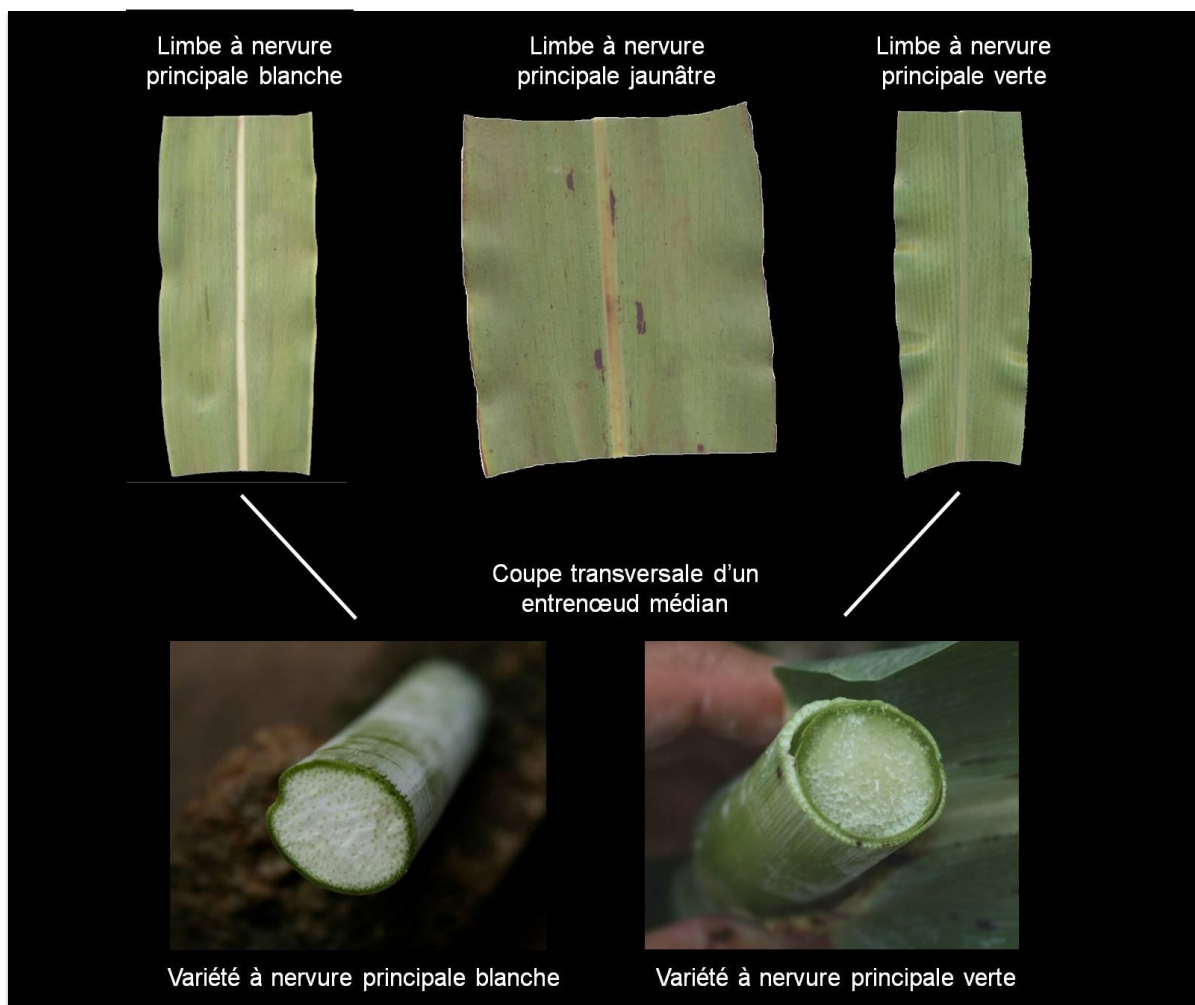


Figure 6-1. Illustration de la variation de coloration de la nervure principale chez trois variétés provenant de l'essai date de semis de Sotuba en 2010, avec de gauche à droite des plantes à nervure blanche, jaunâtre et verte. Cette différence de coloration, en particulier entre les plantes à nervures blanches et celles à nervures vertes, est associée au niveau de la tige à une différence de jutosité des entrenœuds nettement visible à l'œil nu. Le parenchyme des variétés à nervure blanche apparaît très blanc et deshydraté.

6.2. L'accumulation de saccharose se produit avant floraison chez les variétés sucrées de sorgho cultivées en conditions optimales

La littérature au sujet de la cinétique d'accumulation du saccharose (le principal glucide de stockage) dans la tige des variétés sucrées de sorgho est controversée. Les études rapportent toutefois que l'accumulation se déroulerait entre le stade 5 décrit par Vanderlip et Reeves (1972), c'est-à-dire à partir du moment où la surface foliaire est maximale et que le pédoncule est en cours d'élongation, et le stade 6 décrit par les mêmes auteurs, qui est la floraison. Les conditions de culture très différentes et la diversité des variétés utilisées lors des études sont certainement la cause de ces

divergences de résultats. En effet, nos cinétiques en serre montrent que sous 13h de photopériode (PP), et à l'échelle de la tige, les concentrations en glucides à floraison et à maturité physiologique ne sont pas différentes (Figures 5.3A, B). A l'échelle des entrenœuds, nos mesures montrent qu'en-dessous du deuxième entrenœud sous le pédoncule, la concentration maximale en saccharose est atteinte à floraison chez la lignée stérile et que plus des trois quarts de la concentration finale est atteinte chez les variétés fertiles (Figures 5.4A, C). Ces résultats sont tout à fait représentatifs de ce qui peut être observé sur le terrain en conditions tropicales (Figure 4.3) et confirment les concentrations très élevées à floraison observées par Ferraris (1981) dans leur expérience sur la variété Rio et par Zhao *et al.* (2009). Une augmentation de la concentration en glucides après floraison, rapportée également dans la littérature (expérience 1 de Ferraris, 1981 ; Lingle, 1987 ; Fortmeier et Schubert, 1995), fut cependant observée en serre sous 12h de PP. Le remplissage de la tige eut lieu alors majoritairement après la floraison, et plus particulièrement après le remplissage du grain chez la lignée fertile (Figures 5.3C, D). Toutes ces observations suggèrent qu'il n'y a probablement pas qu'un seul patron d'accumulation des glucides chez le sorgho, et Ferraris (1981) l'a probablement constaté dans son étude. Le choix de la variété, et les conditions de culture (photopériode) ont un impact sur les conclusions tirées.

6.3. La concentration en glucides dans l'entrenœud dépend de son âge

Comment expliquer de telles différences de cinétique d'accumulation de glucides en serre ? Les mesures de concentration en glucides en fonction de l'âge de l'entrenœud ont répondu à cette question (Figure 5.5). Nous avons ainsi constaté que la concentration en saccharose dans les entrenœuds augmentait de façon continue dès les premiers jours de l'élongation et que les cinétiques des plantes cultivées à 12h ou 13h de PP étaient relativement proches. La principale différence apparaissait alors au niveau de la phénologie des plantes. La durée de la phase végétative à 13h de PP fut telle que la concentration en glucides mesurée à floraison équivalait à celle mesurée à maturité physiologique chez les plantes cultivées à 12h de PP. Cependant, la concentration finale de l'entrenœud étudié n'était pas différente entre les deux conditions de culture.

Les données dont nous disposons sur IS2848 indiquaient que la durée entre le semis et la floraison pouvait varier de 50 à 60 jours à Bamako, au Mali, à 80 jours à Montpellier. Avec une photopériode de 13h, nos plantes ont mis 95 jours (un peu plus de 1200 degrés-jours) pour fleurir, alors qu'à 12h de photopériode, elles ont mis seulement 68 jours (environ 900 degrés-jours). La différence d'une heure de photopériode a suffi à allonger la durée la phase photosensible, et donc la phase végétative, ce qui a permis d'éviter la synchronisation de la maturité des entrenœuds et de

l'initiation paniculaire telle que décrite par Vanderlip et Reeves (1972). Nos résultats concordent ainsi avec les deux cinétiques rapportées dans la littérature et avec l'idée que la relation entre l'accumulation des sucres et le temps serait quasi linéaire (Ferraris et Charles-Edwards, 1986). Hoffmann-Thoma *et al.* (1996) avaient montré que l'accumulation de glucides chez le sorgho et la canne à sucre était semblable, et donc qu'elle était indépendante de la phase de reproduction. A notre connaissance leurs observations n'avaient encore jamais été confirmées, très certainement parce que personne n'a répété leur étude en appliquant 16h de photopériode aux plantes.

6.4. Rendements élevés en grains et accumulation de glucides ne sont pas incompatibles

Tel que suggéré dans certaines études, l'accumulation importante de glucides dans la tige des variétés sucrées pourrait être causée par la présence d'une petite panicule chez ces variétés, donc résulter d'une force de puits paniculaire réduite. Nos essais au champ montrent que ce n'est pas le cas et que des variétés comme IS 6351 (semis de juin), IS10234, IS15443 et particulièrement SSM215 ont un rendement en grains intéressant tout en maintenant une concentration égale ou supérieure à 300 mg de glucides par gramme de poids sec de tige (Figure 4.1, Tableau 4.1) ; c'est la concentration maximale que nous ayons mesuré en serre. Des rendements en grains encore plus élevés auraient pu être obtenus si nos essais n'avaient pas subi les attaques répétées des oiseaux et des insectes (pour les variétés tardives) malgré la présence de sachets de protection et de chasseurs d'oiseaux en journée.

6.5. La biomasse de tige et la durée du cycle sont deux critères clés d'une production élevée de glucides

Les réserves pré-florales n'ont pas été affectées en serre et l'ont rarement été dans notre essai au champ lorsque les plantes étaient semées en juin (Figures 4.3 et 5.3). La chute de concentration en glucides observée lors du semis de juillet et l'analyse de la relation entre l'indice de récolte (*harvest index*) et la diminution de concentration en glucides entre les stades de floraison et de maturité sont donc intéressantes. Elles montrent que plus la biomasse de tige produite est élevée, moins la concentration en glucides chute pendant le remplissage du grain. Ce résultat est particulièrement important dans cette étude sur l'effet de la date de semis. La biomasse de tige produite est donc directement concernée dans l'optique d'un sorgho double usage grains / sucres. Lors du semis de juin, l'utilisation des réserves carbonées de la tige pour le remplissage du grain ne peut pas être exclue, mais la biomasse de tige produite plus importante qu'en juillet pour une concentration en glucides similaire pourrait masquer le flux des réserves. Une partie des assimilats

produits après la floraison a aussi pu être alloué de nouveau à la tige entre la floraison et la maturité, cachant ainsi une remobilisation temporaire de C ; il aurait été intéressant de rajouter une mesure à un stade intermédiaire aurait pu nous permettre de vérifier cette hypothèse. Il est également possible que les conditions de croissance des variétés (pas de stress hydrique ou nutritionnel, fort rayonnement) n'aient tout simplement pas favorisé l'utilisation des réserves glucidiques (Kiniry *et al.*, 1992). Lors du semis de juillet, les variétés de petite taille comme IS2814 et IS2848 ou de faible diamètre comme IS26731, avec des réserves glucidiques et des surfaces foliaires moins importantes, ont dû puiser dans leur réserve pour assurer le remplissage des grains. Toutefois, chez IS5867, IS10234, IS26833 et IS33261, des génotypes de grande taille, la capacité de stockage importante de la tige n'a pas suffi au maintien des réserves entre la floraison et maturité.

Cette possible compétition pour les assimilats entre les deux principaux puits de la plante n'a cependant pas été observée pour le semis de juin, qui permet comme dans le cas des photopériodes élevées en serre de laisser davantage de temps à la plante pour réaliser les différentes étapes de son cycle. Pour cette date de semis, la combinaison entre les fortes biomasses de tige produites et les concentrations élevées de glucides stockées permet une production de glucides très importante. Leur concentration et leur extraction seront également d'autant plus élevés que la quantité d'eau présente dans la tige sera élevée. L'importance de la durée du cycle sur la productivité en glucides avait été suggérée par Ferraris (1981a) et Ferraris et Charles-Edwards (1986). Elle est confirmée par nos études dans un contexte soudano-sahélien.

6.6. Accumulation de glucides : importance d'adresser les activités enzymatiques en fonction du stade de croissance et de développement de la plante et des entrenœuds

Le sorgho a fait l'objet de nombreuses études par le passé, particulièrement entre les années 70 et le début des années 90 (cf. section 2.3.1), afin d'étudier les relations source-puits de carbone mais dans un contexte de productivité en grains. Ces dernières années, le sorgho (sucré) a connu un regain d'intérêt car la sélection pour l'augmentation de la production de sucres a tendance à stagner chez la canne à sucre (Grof et Campbell, 2001 ; Jackson, 2005) et car le sorgho est mieux adapté aux conditions limitées en eau. La complexité du génome de cette espèce (nombre élevé de chromosomes, polyploïdie) a donc favorisé les recherches sur le sorgho afin de s'en servir de plante modèle pour explorer les bases génétiques de l'accumulation des glucides (Ritter *et al.*, 2004 ; Ritter, 2007).

Cependant, les études sur le sorgho sucré montrent que ni l'activité des principales enzymes du métabolisme carboné, ni même leur expression, ne peuvent expliquer le stockage de glucides

dans les tiges (Lingle, 1987 ; Tarpley *et al.*, 1994 ; Hoffmann-Thoma *et al.*, 1996 ; Qazi *et al.*, 2012). La diversité des génotypes étudiés et les conditions expérimentales en sont certainement la cause. Hoffmann-Thoma *et al.* (1996) n'ont observé aucune activité des invertases neutres et acides dans leur étude, alors que nous avons noté une activité de l'invertase acide dans la nôtre (Figure 5.8). Hoffmann-Thoma *et al.* (1996) n'ont cependant pas étudié les premiers stades d'élongation des entrenœuds. Nous n'avons pas observé d'activité de l'invertase neutre (données non publiées) alors qu'elle fut démontrée chez le cultivar Rio par Lingle (1987). Qazi *et al.* (2012) ont récemment montré qu'il n'était pas plus facile de différencier les sorghos à grains des sorghos sucrés par les activités enzymatiques ou l'expression des gènes de ces enzymes ou de transporteurs de sucres.

En revanche, de plus en plus d'études suggèrent un lien étroit entre la croissance et le stockage de glucides chez la canne à sucre (Inman-Bamber *et al.*, 2008, 2009, 2010). Ainsi, les différences de rendements en glucides observées chez les clones sucrés et non sucrés chez cette espèce pourraient uniquement résulter de patrons différents d'allocation du carbone entre les différents puits (feuilles, tiges, talles) et de finalité différente de ces composés carbonés (glucides structuraux ou non structuraux). L'augmentation du stockage de saccharose dans les tiges lorsque la croissance de cette dernière est ralentie appuie cette théorie (Inman-Bamber *et al.*, 2008, 2009, 2010). Cette observation s'apparente à nos résultats en serre démontrant le lien entre croissance et âge physiologique des entrenœuds.

6.7. Supprimer la panicule ne permet pas d'augmenter significativement la production de glucides

L'absence d'augmentation de concentration en glucides dans la tige après la floraison suggère une allocation des assimilats post-floraux principalement à destination du remplissage du grain et au métabolisme de base. Afin d'estimer ce qui peut être perçu comme une perte de carbone pour la production de glucides (jus sucré), nous avons supprimé la panicule de quelques plantes dans nos essais au champ et avons utilisé en serre les lignées (isogéniques) stérile et fertile d'une même variété. Le recours à la stérilité nous permettait d'éviter les dommages parfois observés (nécrose, dessèchement, léger pourrissement) qui peuvent être causés à l'extrémité du pédoncule en sectionnant la panicule. Nos résultats montrent que la suppression du puits paniculaire ne garantit pas d'obtenir de meilleurs rendements en glucides. En serre, les tiges des plantes stériles et fertiles avaient des concentrations en glucides similaires dans les entrenœuds (Figure 5.3). Au champ, une augmentation de concentration fut observée chez cinq variétés parmi les 14 étudiées pour le semis

de juillet, chez deux variétés uniquement pour le semis d'août, mais chez aucune variété pour le semis de juin (Figure 4.4).

Cette absence de réponse à la suppression du puits paniculaire n'a pas été confirmée par Ferraris (1981), Fortmeier et Schubert (1995) et Rajendran *et al.* (2000). Elle l'avait été, par contre, par Broadhead (1973). Ce dernier a étudié le cultivar Rio, comme Ferraris quelques années plus tard, mais n'a observé aucune augmentation de la production de glucides, aussi bien dans le cas d'une suppression de la panicule au stade 5 (*boot stage*) qu'au stade 6 (floraison) de développement. Au contraire, l'augmentation de production notée par Ferraris (1981) est très intéressante. D'après les estimations, elle correspondait à la quantité de carbone qui avait été allouée aux grains. Un tel résultat n'a pas été observé lors de nos études (Figure 5.6). Dans le cas des études de Fortmeier et Schubert (1995) et de Rajendran *et al.* (2000), l'augmentation fut inférieure à une vingtaine de grammes de glucides stockés par plante. Chez certaines variétés étudiées par Rajendran *et al.* (2000), elle était même négligeable. Ces résultats s'apparentent donc davantage aux nôtres plutôt qu'à ceux de Ferraris (1981) qui amènent à la conclusion qu'il pourrait être intéressant de cultiver des lignées stériles lorsque la culture est destinée à la production de sucre.

Les résultats contrastés de ces études sont probablement dus, en partie, aux conséquences de la suppression de panicule sur la qualité et la quantité de biomasse produite. Suite au traitement, Broadhead (1973) avait noté une diminution de la quantité de jus extraite ; celle-ci expliquait alors l'augmentation de brix sans augmentation de la production de glucides. Rajendran *et al.* (2000) avaient noté une augmentation du diamètre des plantes, et aussi du rendement en jus, qui allait de paire avec la quantité plus faible de fibres dans la tige. Mais ils avaient aussi observé dans le jus une chute de pureté (correspondant au ratio saccharose/Brix) et de concentration en saccharose. Ferraris (1981), au contraire, fait part d'une augmentation de pureté et de concentration en saccharose dans le jus avec le traitement sans changement de quantité de fibres produites. Il en conclut alors que la culture de variétés stériles, comme chez la canne à sucre, pourrait être un moyen d'augmenter la production en sucres chez le sorgho. Toutes ces observations confirment, là encore, les fortes interactions G x E chez cette espèce et les conséquences que cela peut avoir sur les conclusions tirées ; cela souligne encore la nécessité d'étudier plus largement la diversité génétique existante pour mieux appréhender les patrons de compétition pouvant exister entre remplissage du grain et accumulation de glucides dans les tiges.

6.8. Conclusion et perspectives

6.8.1. Potentiel des variétés étudiées pour un double usage dans les conditions d'études : vers la définition d'un idéotype

Nos résultats confirment le potentiel du sorgho comme céréale multi-usages. Les variétés que nous avons étudiées sont des *landraces*. Elles ne sont donc pas issues de programmes de sélection et ne peuvent pas être caractérisées comme des élites, que cela soit pour la production de grains ou de glucides. Une seule variété parmi les 14 étudiées, IS23254, rassemble les critères des paysans africains (goût et quantité du jus, composition en fibres) pour juger un sorgho comme sucré.

Pourtant, la plupart de ces variétés ont atteint des concentrations en glucides significatives, parfois plus élevées que des variétés de référence comme Keller, Rio et Ramada, et proches de celles mesurées chez la canne à sucre. Couplées à une production de biomasse de tige élevée lorsque les variétés ont un cycle long (notamment les variétés photopériodiques semées tôt dans la saison), telles qu'IS23142 et IS33261 qui ont produit à maturité entre 70 et 80 t.ha⁻¹ de poids frais de tiges (Figure 6.2), de telles concentrations en glucides se traduisent en quantités élevées de glucides stockées dans les tiges peu remobilisées pour le remplissage des grains.



Figure 6-2. Illustration de la quantité de biomasse fraîche produite très importante par la variété IS33261 à (A) Cinzana, lors du semis de juillet, et (B) Sotuba, lors du semis de juin.

Les 14 variétés étudiées étaient adaptées aux conditions de culture rencontrées à Bamako ; elles ont pu fleurir et les grains ont pu arriver à maturité uniquement avec les réserves en eau présentes dans le sol, même pour les plus tardives. Plusieurs variétés ont donné des rendements en grains supérieurs à 2.5 tonnes par hectare, c'est-à-dire supérieurs à 50g par plante avec notre densité de semis. La qualité des grains à maturité a été évaluée en laboratoire, à Bamako. Les analyses ont révélé que les grains des variétés IS5867, IS6351, IS20351, IS33261 et SSM215 présentaient de très bonnes caractéristiques de couleur et de consistance à la transformation lors de la préparation du tô, (préparation locale à base de sorgho). Les panicules souvent compactes de nos variétés favorisaient cependant la présence d'insectes entre les grains, et sans sachets de protection nous n'aurions jamais eu de récolte de grains. Une seule variété parmi les 14 étudiées n'a pas subi d'attaques.

Au moment de faire le choix des 14 variétés à étudier, nous avons volontairement décidé de ne pas sélectionner uniquement des sorghos sucrés au sens strict, car ces variétés sont rarement cultivées pour l'alimentation humaine, du moins au Mali, à cause de la mauvaise qualité du grain. Suite aux résultats de tests préliminaires qui ont montré que les variétés à NB pouvaient donner un bon rendement en jus lorsque leur tige était grosse et constituée de nombreux nœuds, nous avons cherché au sein de la *core collection* des variétés à NB de ce type et dont le brix était élevé. Ce choix s'est révélé intéressant car il nous a permis de sélectionner une de nos meilleures variétés, IS33261, et de montrer que les variétés à NB pouvaient être compétitives vis-à-vis des variétés à NV pour la production de jus sucré. En termes de schéma de sélection, cette observation est importante car elle pose la question de la meilleure stratégie à adopter : est-il plus judicieux d'augmenter la jutosité des tiges des variétés à NB, ou d'améliorer la qualité du grain des sorghos sucrés (NV).

6.8.2. *Études à mener pour le futur vers des idéotypes de sorgho double usage*

Nos résultats ne concernent qu'une année d'étude, donc il serait intéressant de les répéter pour étudier les variations interannuelles, et en particulier pour comparer des années pour lesquelles le régime des pluies est différent. Il serait notamment intéressant de confronter nos variétés les plus photopériodiques à des environnements plus secs, plus au nord de Bamako afin de voir si elles sont capables de produire des grains tout en maintenant des concentrations élevées en glucides dans les tiges. Les données acquises durant cette thèse sur le site de Cinzana (plus au nord de Bamako) sur huit des génotypes étudiés dans les chapitres 3 et 4 permettront d'amorcer cette analyse des interactions G x E. D'autres essais avec une meilleure quantification du niveau de stress hydrique vécu par chaque génotype seront cependant nécessaires.

La littérature souligne la difficulté de mettre en évidence l'existence de marqueurs biochimiques ou moléculaires pour le phénotypage. Nos études enzymologiques confirment ce point

de vue, mais sur un seul génotype dans sa version stérile et fertile (Chapitre 5). Les analyses enzymologiques et métaboliques en cours sur cinq génotypes étudiés en serre en 2010 durant cette thèse (dont quatre font partie des 14 étudiés au champ) en conditions de stress hydrique post-floral et en conditions bien irriguées, viendront compléter les observations sur la pertinence de marqueurs pour discriminer des comportements métaboliques relatifs à la production de sucres et de grains par le sorgho. Toutefois, comme déjà suggéré à propos des comportements observés suite à l'ablation de la panicule, il n'existe probablement pas de patron unique d'accumulation de glucides dans les tiges et les grains chez le sorgho, étant donnée sa grande diversité génétique et phénotypique. Son génome est certes moins complexe que celui de la canne à sucre, mais la présence de la panicule rajoute un niveau de complexité dans les relations source-puits. La force de puits de la panicule est généralement estimée par sa taille (et par le nombre de grains) ; on considère ainsi qu'une grosse panicule représente un coût plus élevé en carbone pour la plante qu'une panicule de petite taille. Les grains, au début de leur développement, sont toutefois capables de photosynthétiser et participent donc à leur remplissage (Fisher et Wilson, 1971b). Mais la morphologie très variée des panicules laisse à penser que cette participation pourrait être variable suivant la couleur des grains et la taille des glumelles. Cette participation pourrait avoir une incidence sur l'utilisation des réserves de la tige. L'activité des enzymes dans la panicule n'a été que peu étudiée également et serait intéressante à adresser dans la suite de cette thèse.

Enfin, une meilleure connaissance des valeurs d'échanges gazeux, de préférence au niveau de la plante entière, seront nécessaires pour mieux quantifier le fonctionnement de la source en carbohydrates ainsi que celui d'autres puits (assimilation, respiration, bilans carbonés) non étudiés dans ce travail. Il sera en effet déterminant d'évaluer dans quelle mesure il existe une diversité génétique au niveau de ces mécanismes et quel serait leur impact dans les relations source-puits vers un sorgho double usage. Si cela s'avère pertinent, il s'agira de trouver des moyens de phénotyper ces processus directement sur le terrain, par exemple à l'aide de mesures de fluorescence.

Il est à noter que les mécanismes source-puits étudiés dans cette thèse permettent actuellement d'améliorer la modélisation des interactions $G \times E$ sous-jacentes à la production de sucre et de grains du sorgho par les modèles de croissance de la plante et du peuplement développés dans le projet *Sweetfuel* par le CIRAD (modèle Ecomeristem, Luquet *et al.*, 2006 ; modèle SAMARA, Dingkuhn *et al.*, publication en cours). Ces modèles pourront alors être utilisés pour appuyer le phénotypage ou l'exploration d'idéotypes face à un environnement cible pour le sorgho à vocation de double usage.

6.8.3. Perspectives vers d'autres projets

Les résultats de cette thèse donnent de nouvelles pistes pour orienter le phénotypage de collections ou populations de sorgho à vocation de production de sucre et de grains. Ils soulignent aussi la nécessité d'explorer plus largement la diversité des caractères identifiés comme intéressants dans cette optique ainsi que leurs interactions G x E. Notre démarche d'utiliser des variétés de la *core collection* « sorgho » du CIRAD connues des généticiens s'est donc avérée pertinente.

Les résultats de cette thèse servent aujourd'hui de base pour définir des protocoles de phénotypage de la diversité génétique du sorgho dans plusieurs projets à venir, notamment un projet sur la création de sorghos photopériodiques sucrés récemment soumis par l'Embrapa (partenaire brésilien du CIRAD dans le projet *Sweetfuel*) avec l'IER (partenaire malien dans ce projet et cette thèse). De façon similaire, les protocoles de phénotypage de la diversité rencontrée dans la production de biomasse du sorgho (à vocation de productions de bioproduits : carburants de deuxième génération, bioplastiques, etc.) serviront dans le cadre du projet ANR « Biomass Crop For the Future » qui démarrera en septembre 2012.

Références

- Ajanovic A.** 2011. Biofuels versus food production: Does biofuels production increase food prices? *Energy* **36**, 2070-2076.
- Ali ML, Rajewski JF, Baenziger PS, Gill KS, Eskridge KM, Dweikat I.** 2008. Assessment of genetic diversity and relationship among a collection of US sweet sorghum germplasm by SSR markers. *Molecular Breeding* **21**, 497-509.
- Almodares A, Hadi MR.** 2009. Production of bioethanol from sweet sorghum: a review. *African Journal of Agricultural Research* **4**, 772–780.
- Andrews DJ.** 1973. Effect of date of sowing on photosensitive Nigerian sorghums. *Experimental Agriculture* **9**, 337–346.
- Anglani C.** 1998. Sorghum carbohydrates – A review. *Plant Foods for Human Nutrition* **52**, 77-83.
- Archbold HK.** 1945. Some factors concerned in the process of starch storage in the barley grain. *Nature* **156**, 70-73.
- Azcón-Bieto J, Lambers H, Day DA.** 1983. Effect of photosynthesis and carbohydrate status on respiratory rates and the involvement of the alternative pathway in leaf respiration. *Plant Physiology* **72**, 598-603.
- Balole TV.** 2001. Strategies to improve yield and quality of sweet sorghum as a cash crop for small scale farmers in Botswana. PhD Thesis, Faculty of Biological and Agricultural Sciences, University of Pretoria.

- Barro-Kondombo CP, Vom Brocke K, Chantereau J, Sagnard F, Zongo J-D.** 2008. Variabilité phénotypique des sorghos locaux de deux régions du Burkina Faso : la Boucle du Mouhoun et le Centre-Ouest. *Cahiers Agricultures* **17**, 107-113.
- Bazile D, Soumaré M.** 2004. Gestion spatiale de la diversité variétale en réponse à la diversité écosystémique : le cas du sorgho [*Sorghum bicolor* (L) Moench] au Mali. *Cahiers Agriculture* **13**, 480-487.
- Bazzaz FA, Carlson RW, Harper JL.** 1979. Contribution to reproductive effort by photosynthesis of flowers and fruits. *Nature* **279**: 554-555.
- Ben Mokhtar I, Houle G.** 2005. Photosynthate contribution by sepals alleviates the carbon cost of reproduction in the spring ephemeral *Floerkea proserpinacoides* (Limnanthaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* **92**, 438-444.
- Benzing DH, Friedman WE, Peterson G, Renfrow A.** (1983). Shootlessness, velamentous roots and the pre-eminence of Orchidaceae in the epiphytic biotope. *American Journal of Botany* **70**, 121-133.
- Berenguer MJ, Faci JM.** 2001. Sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) yield compensation processes under different plant densities and variable water supply. *European Journal of Agronomy* **15**, 43-55.
- Berenji J, Dahlberg J.** 2004. Perspectives of Sorghum in Europe. *Journal of Agronomy and Crop Science* **190**, 332-338.
- Bezot P.** 1963. L'amélioration des sorghos au Tchad. *Agronomie Tropicale* **18**, 985-1007.
- Bidinger F, Musgrave RB, Fisher RA.** 1977. Contribution of stored pre-anthesis assimilates to grain yield in wheat and barley. *Nature* **270**, 431-433.
- Blum A.** 1998. Improving wheat grain filling under stress by stem reserve mobilisation. *Euphytica* **100**, 77-83.
- Blum A, Golan G, Mayer J, Sinmena B.** 1997. The effect of dwarfing genes on sorghum grain filling from remobilized stem reserves, under stress. *Field Crops Research* **52**, 43-54.
- Blümmel M, Rao SS, Palaniswami S, Shah L, Reddy BVC.** 2009. Evaluation of sweet sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) used for bio-ethanol production in the context of optimizing whole plant utilization. *Animal Nutrition and Feed Technology* **9**, 1-10.
- Boehringer SA.** 1984. Methods of enzymatic food analysis using single reagents. Boehringer, GmbH, Mannheim, Germany, 79pp.
- Borrell A, Hammer G, Van Oosterom.** 2001. Stay-green: A consequence of the balance between supply and demand for nitrogen during grain filling? *Annals of Applied Biology* **138**, 91-95.
- Botha FC, Black KG.** 2000. Sucrose phosphate synthase and sucrose synthase activity during maturation of internodal tissue in sugarcane. *Australian Journal of Plant Physiology* **27**, 81-85.
- BP.** 2007. Statistical review of World energy. 45p.

- Bradford MM.** 1976. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254.
- Broadhead DM.** 1973. Effects of deheading on stalk yield and juice quality of Rio sweet sorghum. *Crop Science* **13**, 395-396.
- Buchanan-Wollaston V, Earl S, Harrison E, Mathas E, Navabpour S, Page T, Pink D.** 2003. The molecular analysis of leaf senescence – a genomics approach. *Plant Biotechnology Journal* **1**, 3-22.
- Chantereau, J., Trouche, G., Luce, J., Deu, M., Hamon, P.** 2007. Le sorgho. In: L'amélioration des plantes tropicales. Eds Charrier, A., Jacquot, M., Hamon, S., Nicolas, D., p. 565-590. Collection Repères CIRAD/IRD.
- Chapman SC, Cooper M, Butler DG, Henzell RG.** 2000. Genotype by environment interactions affecting grain sorghum. I. Characteristics that confound interpretation of hybrid yield. *Australian Journal of Agricultural Research* **51**, 197-207.
- Cheng JJ, Timilsina GR.** 2011. Status and barriers of advanced biofuel technologies : A review. *Renewable Energy* **36**, 3541-3549.
- Clerget B.** 2008a. Variabilité de la vitesse de développement chez le sorgho cultivé (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) et relation avec le photopériodisme. *Cahiers Agriculture* **17**, 101-106.
- Clerget B, Dingkuhn M, Chantereau J, Hemberger J, Louarn G, Vaksman M.** 2004. Does panicle initiation in tropical sorghum depend on day-to-day change in photoperiod? *Field Crops Research* **88**, 21-37.
- Clerget B, Dingkuhn M, Gozé E, Rattunde HFW, Ney B.** 2008b. Variability of phyllochron, plastochron and rate of increase in height in photoperiod-sensitive *Sorghum* varieties. *Annals of Botany* **101**, 579-594.
- Craufurd PQ, Qi A.** 2001. Photothermal adaptation of sorghum (*Sorghum bicolor*) in Nigeria. *Agricultural and Forest Meteorology* **108**, 199-211.
- Curtis DL.** 1968. The relationship between the date of heading of Nigerian sorghums and the duration of growing season. *Journal of Applied Ecology* **5**, 215–226.
- Danielsen F, Beukema H, Burgess ND, Parish F, Brühl CA, Donald PF, Murdiyarso D, Phalan B, Reijnders L, Struwig M & Fitzherbert EB.** 2009. Biofuel Plantations on Forested Lands: Double Jeopardy for Biodiversity and Climate. *Conservation Biology* **23**, 348-358.
- DeLacy IH, Kaul S, Rana RA, Cooper M.** 2010. Genotypic variation for grain and stover yield of dryland (rabi) sorghum in India 1. Magnitude of genotypexenvironment interactions. *Field Crops Research* **118**, 228–235.
- Deu M, Rattunde F, Chantereau J.** 2006. A global view of genetic diversity in cultivated sorghums using a core collection. *Genome* **49**, 168-180.
- Deu M, Sagnard F, Chantereau J, Calatayud C, Vigouroux Y, Pham J-L, Mariac C, Kapram I, Mamadou A, Gérard B, Ndjunga J, Bezançon G.** 2010. Spatio-temporal dynamics of genetic diversity in *Sorghum bicolor* in Niger. *Theoretical and Applied Genetics* **120**, 1301-1313.

- De Vries SC, van de Ven GWJ, van Ittersum MK, Giller KE.** 2010. Resource use efficiency and environmental performance of nine major biofuel crops, processed by first-generation conversion techniques. *Biomass & Bioenergy* **34**, 588-601.
- Dicko MH, Gruppen H, Traoré AS, Voragen AGJ, van Berkel WJH.** 2006. Sorghum grain as human food in Africa: relevance of content of starch and amylase activities. *African Journal of Biotechnology* **5**, 384-395.
- Dingkuhn M, Singh BB, Clerget B, Chantereau J, Sultan B.** 2006. Past, present and future criteria to breed crops for water limited environments in West Africa. *Agricultural Water Management* **80**, 241-261.
- Dingkuhn M, Kouressy M, Vaksman M, Clerget B, Chantereau J.** 2008. Applying to sorghum photoperiodism the concept of threshold-lowering during prolonged appetite. *European Journal of Agronomy* **28**, 74-89.
- Doggett H.** 1988. Sorghum, John Wiley & Sons, New York, NY, USA; Longman Scientific and Technical, Harlow, UK.
- Evans LT, Rawson HM.** 1970. Photosynthesis and respiration by the flag leaf and components of the ear during grain development in wheat. *Australian Journal of Biological Sciences* **23**, 245-254.
- Evans LT, Wardlaw IF.** 1976. Aspects of the comparative physiology of grain yield in cereals. *Advances in Agronomy* **26**, 301-360.
- FAOSTAT.** 2011. <http://faostat.fao.org>.
- Fedoroff NV, Cohen JE.** 1999. Plants and populations : Is there time? *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**, 5903-5907.
- Ferraris R.** 1981. Early assessment of sweet sorghum as an agro-industrial crop. 2. Maturity factors. *Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry* **21**, 83-90.
- Ferraris R, Charles-Edwards DA.** 1986. Comparative analysis of the growth of sweet and forage sorghum crops. II. Accumulation of soluble carbohydrates and nitrogen. *Australian Journal of Agricultural Research* **37**, 513-522.
- Fisher KS, Wilson GL.** 1971a. Studies of grain production in *Sorghum bicolor* (L. Moench). I. The contribution of pre-flowering photosynthesis to grain yield. *Australian Journal of Agricultural Research* **22**, 33-37.
- Fisher KS, Wilson GL.** 1971b. Studies of grain production in *Sorghum vulgare*. II. Sites responsible for grain dry matter production during the post-anthesis period. *Australian Journal of Agricultural Research* **23**, 39-47.
- Fisher KS, Wilson GL.** 1975b. Studies of grain production in *Sorghum bicolor* (L. Moench). III The relative importance of assimilate supply, grain growth capacity and transport system. *Australian Journal of Agricultural Research* **26**, 11-23.
- Fisher KS, Wilson GL.** 1975b. Studies of grain production in *Sorghum bicolor* (L. Moench). IV. Some effects of increasing and decreasing photosynthesis at different stages of the plant's development on the storage capacity of the inflorescence. *Australian Journal of Agricultural Research* **26**, 25-30.

- Fortmeier R, Schubert S.** 1995. Storage of non-structural carbohydrates in sweet sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench): Comparison of sterile and fertile lines. *Journal of Agronomy and Crop Science* **175**, 189-193.
- Foulkes MJ, Sylvester-Bradley R, Weightman R, Snape JW.** 2007. Identifying physiological traits associated with improved drought resistance in winter wheat. *Field Crop Research* **103**, 11–24.
- Gallagher JN, Biscoe PV, Hunter B.** 1976. Effects of drought on grain growth. *Nature* **264**, 541-542.
- Gheewala SH, Berndes G, Jewitt G.** 2011. The bioenergy and water nexus. *Biofuel, Bioproducts and Biorefining* **5**, 353-360.
- Girardin P.** 2000. Ecophysiologie du maïs : fonctionnement de la plante et de la culture. Itcf/Institut Technique des Céréales (eds). 323p.
- Goldsworthy PR.** 1970a. The sources of assimilate for grain development in tall and short sorghum. *The Journal of Agricultural Science* **74**, 523-531.
- Goldsworthy PR.** 1970b. The growth and yield of tall and short sorghums in Nigeria. *The Journal of Agricultural Science* **75**, 109-122.
- Goldsworthy PR, Tayler RS.** 1970. The effect of plant spacing on grain yield of tall and short sorghum in Nigeria. *Journal of Agricultural Science* **74**, 1-10.
- Grenier C, Bramel-Cox PJ, Hamon P.** 2001a. Core collection of sorghum: I. Stratification based on eco-geographical data. *Crop Science* **41**, 234-239.
- Grenier C, Hamon P, Bramel-Cox PJ.** 2001b. Core collection of sorghum: II. Comparison of the three random sampling strategies. *Crop Science* **41**, 241-246.
- Gressel J.** 2008. Transgenics are imperative for biofuel crops. *Plant Science* **174**, 246-263.
- Grof CPL, Albertson PL, Bursle J, Perroux JM, Bonnett GD, Manners JM.** 2007. Sucrose-phosphate synthase, a biochemical marker of high sucrose accumulation in sugarcane. *Crop Science* **47**, 1530-1539.
- Grof CPL, Campbell JA.** 2001. Sugarcane sucrose metabolism: scope for molecular manipulation. *Australian Journal of Plant Physiology* **28**, 1-12.
- Grof CPL, Campbell JA, Kravchuk O, Lambrides CJ, Albertson PL.** 2010. Temperature effect on carbon partitioning in two commercial cultivars of sugarcane. *Functional Plant Biology* **37**, 334-341.
- Groom MJ, Gray EM & Townsend PA,** 2008. Biofuels and Biodiversity: Principles for Creating Better Policies for Biofuel Production. *Conservation Biology* **22**, 602-609.
- Guigou M, Lareo C, Pérez LV, Lluberá ME, Vázquez D, Ferrari MD.** 2011. Bioethanol production from sweet sorghum : Evaluation of post-harvest treatments on sugar extraction and fermentation. *Biomass and Bioenergy* **35**, 3058-3062.
- Gutjahr S, Clément-Vidal A, Trouche G, Vaksman M, Thera K, Sonderegger N, Dingkuhn M, Luquet D.** 2010. Functional analysis of sugar accumulation in sorghum stems and its competition with grain filling among contrasted genotypes. In 'Proceedings of Agro 2010: the XIth ESA Congress, August 29th - September 3rd, 2010, Montpellier, France'.

- Harlan JR, de Wet JMJ.** 1972. Simplified classification of cultivated sorghum. *Crop Science*, **12**, 172-176.
- Hausmann BIG, Obilana AB, Ayiecho PO, Blum A, Schipprack W, Geiger HH.** 2000. Yield and yield stability of four population types of grain sorghum in semi-arid area of Kenya. *Crop Science* **40**, 319-329.
- Hill J, Nelson E, Tilman D, Polasky S, Tiffany D.** 2006. Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **130**: 11206-11210.
- Hirel B, Le Gouis J, Ney B, Gallais A.** 2007. The challenge of improving nitrogen use efficiency in crop plants : towards a more central role for genetic variability and quantitative genetics within integrated approaches. *Journal of Experimental Botany* **58**, 2369-2387.
- Hoffmann-Thoma, G, Hinkel K, Nicolay P, Willenbrink J.** 1996. Sucrose accumulation in sweet sorghum stem internodes in relation to growth. *Physiologia Plantarum* **97**, 277-284.
- Hume DJ, Campbell DK.** 1972. Accumulation and translocation of soluble solids in corn stalks. *Canadian Journal of Plant Science* **52**, 363-368.
- Inman-Bamber NG, Bonnett GD, Spillman MF, Hewitt ML, Jackson J.** 2008. Increasing sucrose accumulation in sugarcane by manipulating leaf extension and photosynthesis with irrigation. *Australian Journal of Agricultural Research* **59**, 13-26.
- Inman-Bamber NG, Bonnett GD, Spillman MF, Hewitt ML, Jingsheng X.** 2009. Source-sink differences in genotypes and water regimes influencing sucrose accumulation in sugarcane stalks. *Crop and Pasture Science* **60**, 316-327.
- Inman-Bamber NG, Bonnett GD, Spillman MF, Hewitt ML, Glassop D.** 2010. Sucrose accumulation in sugarcane is influenced by temperature and genotype through the carbon source-sink balance. *Crop and Pasture Science* **61**, 111-121.
- Jackson PA.** 2005. Breeding for improved sugar content in sugarcane. *Field Crops Research* **92**, 277-290.
- Jahn CE, McKay JK, Mauleon R, Stephens J, McNally KL, Bush DR, Leung H, Leach JE.** 2011. Genetic variation in biomass traits among 20 diverse rice varieties. *Plant Physiology* **155**, 157-168.
- Jancovici J-M et Grandjean A.** 2006. Le plein s'il vous plaît. La solution au problème de l'énergie. Editions du Seuil. 190p.
- Kiniry JR, Tischler CR, Rosenthal WD, Gerik TJ.** 1992. Nonstructural carbohydrate utilization by sorghum and maize shaded during grain growth. *Crop Science* **32**, 131-137.
- Kouressy M, Dingkuhn M, Chantereau J, Vaksman M.** 2008a. Leaf longevity and grain yield of sorghum plant types differing in photoperiod sensitivity and plant height. *European Journal of Agronomy* **28**, 195-209.
- Kouressy M, Dingkuhn M, Vaksman M, Heinemann AB.** 2008b. Adaptation to diverse semi-arid environments of sorghum genotypes having different plant type and sensitivity to photoperiod. *Agricultural and Forest Meteorology* **148**, 357-371.

- Kouressy M, Vaksman M, Traoré SB, Traoré PS, Dingkuhn M. 2005.** Le photopériodisme des sorghos africains, une réponse à la variabilité pluviométrique. In : AMMA-CIRAD, ed. *Monitoring and forecasting the African monsoon impacts on agriculture and vegetation (AMMA)*, Dakar, Sénégal, 28/11-2/12/2005.
- Kouressy M, Dingkuhn M, Vaksman M, Clément-Vidal A, Chantereau J. 2008.** Potential contribution of dwarf and leaf longevity traits to yield improvement in photoperiod sensitive sorghum. *European Journal of Agronomy* **28**, 195-209.
- Kouressy M, Traoré S, Vaksman M, Grum M, Maikano I, Soumaré M, Sibiry Traoré P, Bazile D, Dingkuhn M, Sidibé A. 2008.** Adaptation des sorghos du Mali à la variabilité climatique. *Cahiers Agricultures* **17**, 95-100.
- Lafarge TA, Broad IB, Hammer GL. 2002.** Tillering in grain sorghum over a wide range of population densities. Identification of a common hierarchy for tiller emergence, leaf area development and fertility. *Annals of Botany*. **90**, 99-110.
- Lafarge T, Tardieu F. 2002.** A model co-ordinating the elongation of all leaves of a sorghum cultivar was applied to both Mediterranean and Sahelian conditions. *Journal of Experimental Botany* **53**, 715-725.
- Lingle SE. 1987.** Sucrose metabolism in the primary culm of sweet sorghum during development. *Crop Science* **27**, 1214-1219.
- Lingle SE. 1989.** Evidence for the uptake of sucrose intact into sugarcane internodes. *Plant Physiology* **90**, 6-8.
- Lingle SE. 1999.** Sugar metabolism during growth and development in sugarcane internodes. *Crop Science* **39**, 480-486.
- Lingle SE, Tew TL. 2008.** A comparison of growth and sucrose metabolism in sugarcane germplasm from Louisiana and Hawaii. *Crop Science* **48**, 1155-1163.
- Lingle SE, Viator R, Johnson RM, Tew TL, Boykin DL. 2009.** Recurrent selection for sucrose content has altered growth and sugar accumulation in sugarcane. *Field Crops Research* **113**, 306-311.
- Lohaus G, Burba M, Heldt HW. 1994.** Comparison of the contents of sucrose and amino acids in the leaves, phloem sap and taproots of high and low sugar-producing hybrids of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Journal of Experimental Botany* **45**, 1097-1101.
- Lunn JE, Furbank RT. 1997.** Localisation of sucrose-phosphate synthase and starch in leaves of C₄ plants. *Planta* **202**, 106-111.
- Lunn JE, Furbank RT. 1999.** Sucrose biosynthesis in C₄ plants. *New Phytologist* **143**, 221-237.
- Luquet D, Dingkuhn M, Kim HK, Tambour L, Clément-Vidal A. 2006.** EcoMeristem, a model of morphogenesis and competition among sinks in rice: 1. concept, validation and sensitivity analysis. *Functional Plant Biology* **33**, 309-323.
- Makanda I. 2009.** Combining ability and heterosis for stem sugar traits and grain yield components in dual-purpose sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) germplasm. PhD Thesis, Faculty of Science and Agriculture, University of KwaZulu-Natal, Republic of South Africa.

- Makanda I, Tongoona P, Derera L.** 2009a. Quantification of genotypic variability for stem sugar accumulation and associated traits in new sweet sorghum varieties. *African Crop Science Conference Proceedings* **9**, 391-398.
- Makanda I, Tongoona P, Derera J.** 2009b. Combining ability and heterosis of sorghum germplasm for stem sugar traits under off-season conditions in tropical lowland environments. *Field Crops Research* **114**, 272-279.
- Marcelis L.** 1996. Sink strength as a determinant of dry matter partitioning in the whole plant. *Journal of Experimental Botany* **47**, 1281-1291.
- Marcelis LFM, Baan Hofman-Eijer LR.** 2006. The contribution of fruit photosynthesis to the carbon requirement of cucumber fruits as affected by irradiance, temperature and ontogeny. *Physiologia Plantarum* **93**, 476-483.
- McBee GG, Miller FR.** 1982. Carbohydrates in sorghum culms as influenced by cultivars, spacing, and maturity over a diurnal period. *Crop Science* **22**, 381-385.
- McCormick AJ, Cramer MD, Watt DA.** 2006. Sink strength regulates photosynthesis in sugarcane. *New Phytologist* **171**, 759-770.
- McCormick AJ, Watt DA, Cramer MD.** 2009. Supply and demand: sink regulation of sugar accumulation in sugarcane. *Journal of Experimental Botany* **60**, 357-364.
- Medeiros D, Vazquez-Araujo L, Chambers IV E.** 2011. Sorghum: the forgotten grain. *Food Technology* **65**, 52-60.
- Miallet-Serra I, Clément A, Sonderegger N, Rounsard O, Jourdan C, Labouisse J-P, Dingkuhn M.** 2005. Assimilate storage in vegetative organs of coconut (*Cocos nucifera*). *Experimental Agriculture* **41**, 161-174.
- Miller FR, Barnes DK, Cruzado HJ.** 1968. Effect of tropical photoperiods on the growth of sorghum when grown in 12 monthly plantings. *Crop Science* **8**, 449-502.
- Ming R, Liu S, Lin Y, da Silva J, Wilson W, Braga D, van Deynz A, Wenslaff T, Wu K, Moore P, Burnquist W, Sorrells M, Irvine J, Paterson A.** 1998. Detailed alignment of Saccharum and Sorghum chromosomes: comparative organization of closely related diploid and polyploidy genomes. *Genetics* **150**, 1663-1682.
- Muchow RC, Carberry PS.** 1990. Phenology and leaf area development in a tropical grain sorghum. *Field Crops Research* **23**, 221-237.
- Muchow RC, Robertson MJ, Wood AW, Keating BA.** 1997. Assessing limits to sugarcane yield. *Proceedings of the Australian Society of Sugar Cane Technologists* **19**, 221-228.
- Muchow RC, Wilson GL.** 1976. Photosynthetic and storage limitations to yield in sorghum (*Sorghum bicolor* L. (Moench)). *Australian Journal of Research* **27**, 489-500.
- Murteen AE.** 1948. History of research in photoperiodism. In: Murteen AE and Whyte RO, eds. *Vernalization and photoperiodism*. Waltham, Mass., USA: Chronica Botanica Company, 39-61.
- Murray SC, Rooney WL, Hamblin MT, Mitchell SE, Kresovich S.** 2009. Sweet sorghum genetic diversity and association mapping for brix and height. *The Plant Genome* **2**, 48-62.

- Murray SC, Sharma A, Rooney WL, Klein PE, Mullet JE, Mitchell SE and Kresovich S.** 2008. Genetic Improvement of sorghum as a biofuel feedstock: I.QTL for stem sugar and grain nonstructural carbohydrates. *Crop Science* **48**, 2165-2179.
- Nasidi M, Akunna J, Deeni Y, Blackwood D, Walker G.** 2010. Bioethanol in Nigeria: comparative analysis of sugarcane and sweet sorghum as feedstock sources. *Energy and Environmental Science* **3**, 1447-1457.
- Nooden LD, Leopold AC.** 1988. Senescence and aging in plants. Academic Press, San Diego, USA.
- Paul MJ, Foyer CH.** 2001. Sink regulation of photosynthesis. *Journal of Experimental Botany* **52**, 1383-1400.
- Rae AL, Grof CPL, Casu RE, Bonnett GD.** 2005a. Sucrose accumulation in the sugarcane stem: pathways and control points for transport and compartmentation. *Field Crops Research* **92**, 159-168.
- Rae AL, Perroux J, Grof CPL.** 2005a. Sucrose partitioning between vascular bundles and storage parenchyma in the sugarcane stem: a potential role for the ShSUT1 sucrose transporter. *Planta* **220**, 817-825.
- Raghu S, Anderson RC, Daehler CC, Davis AS, Wiedenmann RN, Simberloff D, Mack RN.** 2006. Adding biofuels to the invasive species fire? *Science* **313**, 1742.
- Rajendran C, Ramamoorthy K, Backiyarani S.** 2000. Effect of deheading on juice quality characteristics and sugar yield of sweet sorghum. *Journal of Agronomy and Crop Science* **185**, 23-26.
- Reijnders L.** 2010. Transport biofuel yields from food and lignocellulosic C₄ crops. *Biomass and Bioenergy* **34**, 152-155.
- Ritter KB.** 2007. An investigation into the genetics and physiology of sugar accumulation in sweet sorghum as a potential model for sugarcane. PhD Thesis, School of Land, Crop and Food Sciences, University of Queensland, Australia.
- Ritter K, Chapman SC, Jordan D, Godwin ID, McIntyre CL.** 2004. Investigating the use of sweet sorghum as a model for sugar accumulation in sugarcane. In: T. Fischer, New Directions for a Diverse Planet: Proceedings of the 4th International Crop Science Congress. *4th International Crop Science Congress (4ICSC)*, Brisbane, Australia, (1-5). 26 September-1 October 2004.
- Ritter KB, Jordan DR, Chapman SC, Godwin ID, Mace ES, McIntyre CL.** 2008. Identification of QTL for sugar-related sweet x grain sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) recombinant inbred population. *Molecular Breeding* **22**, 367-384.
- Ritter KB, McIntyre CL, Godwin ID, Jordan DR, Chapman SC.** 2007. An assessment of the genetic relationship between sweet and grain sorghums, within *Sorghum bicolor* ssp. *bicolor* (L.) Moench, using AFLP markers. *Euphytica* **157**, 161-176.
- Rooney L, Waniska R.** 2000. Sorghum food and industrial utilization. In Smith *et al.* (ed.) Sorghum: Origin, History, Technology and Production. John Wiley and Sons, New York. pp. 689-731.

- Sattler SE, Funnell-Harris DL, Pederson JF.** 2010. Brown midrib mutations and their importance to the utilization of maize, sorghum, and pearl millet lignocellulosic tissues. *Plant Science* **178**, 229-238.
- Schnyder H.** 1993. The role of carbohydrate storage and redistribution in the source-sink relations of wheat and barley during grain filling – a review. *New Phytologist* **123**, 233-245.
- Seetharama N, Rao K, Subramanian V, Murty D.** 1987. Screening for sweet stalk sorghums, and environmental effect on stalk sugar concentrations. In 'Technology and applications for alternative uses of sorghum: proceedings of the national seminar'. Parbhani, India, pp 169–179.
- Sieger SM, Kristensen BK, Robson CA, Amirsadeghi S, Eng EWY, Abdel-Mesih A, Møller IA, Vanlerberghe GC.** 2005. The role of alternative oxidase in modulating carbon use efficiency and growth during macronutrient stress in tobacco cells. *Journal of Experimental Botany* **56**, 1499-1515.
- Soumaré M, Kouressy M, Vaksman M, Maikano I, Bazile D, Sibiry Traoré P, Traoré S, Dingkuhn M, Touré A, Vom Brocke K, Somé L, Barro-Kondombo CP.** 2008. Prévion de l'aire de diffusion des sorghos photopériodiques en Afrique de l'Ouest. *Cahiers Agricultures* **17**, 160-164.
- Srinivasa RP, Reddy BVS, Blümmel M, Subbarao GV, Chandraraj K, Reddy PS, Parthasarathy RP.** 2000. Sweet Sorghum as a Biofuel Feedstock: Can there be Food-Feed-Fuel Tradeoffs? In 60th International Executive Council Meeting and 5th Asian Regional Conference of International Commission on Irrigation and Drainage (ICID), 6–11 December 2009 at Vigyan Bhavan, New Delhi, India.
- Steduto P, Katerji N, Puertos-Molina H, Unlu M, Mastrorilli M, Rana G.** 1997. Water-use efficiency of sweet sorghum under water stress conditions. Gas exchange investigations at leaf and canopy scales. *Field Crops Research* **54**, 221–234.
- Stickler FC, Pauli AX.** 1965. Grain producing value of leaf sheaths of grain sorghum. *Agronomy Journal* **53**, 352-353.
- Swaminathan MS.** 2006. An Evergreen Revolution. *Crop Science* **46**, 2293-303.
- Swanson A, Laude H.** 1934. Varieties of sorghum in Kansas. *Kansas Bulletin* **266**, 2–50.
- Tarpley L, Lingle SE, Vietor DM, Andrews DL, Miller FR.** 1994. Enzymatic control of nonstructural carbohydrate concentrations in stems and panicles of Sorghum. *Crop Science* **33**, 446-452.
- Tarpley L, Vietor DM.** 2007. Compartmentation of sucrose during radial transfer in mature sorghum culm. *BMC Plant Biology* **7**, 33.
- Tarpley L, Vietor DM, Miller FR.** 1994. Internodal compartmentation of stem-infused [¹⁴C]sucrose in sweet and grain sorghum. *Crop Science* **34**, 1116-1120.
- Teetor VH, Duclos DV, Wittenberg ET, Young KM, Chawhuaymak J, Riley MR, Ray DT.** 2011. Effects of planting date on sugar and ethanol yield of sweet sorghum in Arizona. *Industrial Crops and Products* **34**: 1293-1300.
- Thorne GN.** 1965. Photosynthesis of ears and flag leaves of wheat and barley. *Annals of Botany* **29**, 317-329.

- Traoré PCS, Kouressy M, Vaksmann M, Tabo R, Maikano I, Traoré SB, Cooper P.** 2007. Climate prediction and agriculture: what is different about sudano-sahelian West Africa? *In*: Sivakumar MVK, Hansen J, eds. *Climate Prediction and Agriculture*. Berlin; Heidelberg: Springer Verlag.
- Traoré SB, Reyniers F-N, Vaksmann M, Kone B, Sidibe A, Yorote A, Yattara K, Kouressy M.** 2000. Adaptation à la sécheresse des écotypes locaux de sorghos du Mali. *Sécheresse* **11**, 227-37.
- Uys L, Botha FC, Hofmeyr JH, Rohwer JM.** 2007. Kinetic model of sucrose accumulation in maturing sugarcane culm tissue. *Phytochemistry* **68**, 2375-2392.
- Vaillant-Gaveau N, Maillard P, Wojnarowicz G, Gross P, Clément C, Fontaine F.** 2011. Inflorescence of grapevine (*Vitis vinifera* L.): a high ability to distribute its own assimilates. *Journal of Experimental Botany* **62**, 4183-4190.
- Vaksmann M, Traoré SB, Kouressy M, Coulibaly H, Reyniers F-N.** 1998. Etude du développement d'un sorgho photopériodique du Mali. *In*: Bacci L, Reyniers F-N, eds. *Le futur des céréales photopériodiques pour une production durable en Afrique semi-aride*. Florence, Italia : CIRAD and CeSIA, 109-122.
- Vanderlip RL, Reeves HE.** 1972. Growth stages of sorghum (*Sorghum bicolor*, [L.] Moench). *Agronomy Journal* **64**, 13-16.
- Vasilakoglou I, Dhima K, Karagiannidis N, Gatsis T.** 2011. Sweet sorghum productivity for biofuels under increased soil salinity and reduced irrigation. *Field Crops Research* **120**, 38-46.
- Ventre EK.** 1948. Sucrose, dextrose and levulose content of some domestic varieties of sorgho at different stages of maturity. *Journal of Agricultural Research* **76**, 145-151.
- Verma AK, Upadhyay SK, Verma PC, Solomon S, Singh SB.** 2011. Functional analysis of sucrose phosphate synthase (SPS) and sucrose synthase (SS) in sugarcane (*Saccharum*) cultivars. *Plant Biology* **13**, 325-332.
- Wardlaw IF, Porter HK.** 1967. The redistribution of stem sugars in wheat during grain development. *Australian Journal of Biological Sciences* **20**, 309-318.
- Weng JH, Takeda T, Agata W, Hakoyama S.** 1982. Studies on dry matter and grain production of rice plants. I. Influence of the reserved carbohydrate until heading stage and the assimilation products during the ripening period on grain production. *Japanese Journal of Crop Science* **51**, 500-509.
- Whittaker A, Botha FC.** 1997. Carbon partitioning during sucrose accumulation in sugarcane internodal tissue. *Plant Physiology* **115**, 1651-1659.
- Williams LE, Lemoine R, Sauer N.** 2000. Sugar transporters in higher plants – diversity of roles and complex regulation. *Trends in Plant Science* **5**, 283-290.
- Woods J.** 2001. The potential for energy production using sweet sorghum in southern Africa. *Energy for Sustainable Development* **5**, 31-38.
- Xue GP, McIntyre CL, Jenkins CLD, Glassop D, van Herwaarden AF, Shorter R.** 2008. Molecular Dissection of Variation in Carbohydrate Metabolism Related to Water-Soluble Carbohydrate Accumulation in Stems of Wheat. *Plant Physiology* **146**, 441-454.

- Zhao YL, Dolat A, Steinberger Y, Wang X, Osman A, Xie GH. 2009.** Biomass yield and changes in chemical composition of sweet sorghum cultivars grown for biofuel. *Field Crops Research* **111**, 55-64.
- Zhu YJ, Komor E, Moore PH. 1997.** Sucrose accumulation in the sugarcane stem is regulated by the difference between the activities of soluble acid invertase and sucrose phosphate synthase. *Plant Physiology* **115**, 609-616.